

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

REACTION DE MITSUDA ET INTRADERMO-RÉACTION AU BCG TUÉ DANS LA LÈPRE. CONCLUSIONS THÉORIQUES ET PRATIQUES.

par H. FLOCH.

(Institut Pasteur de la Guyane Française.)

Les discussions sur l'utilité de la vaccination des enfants par le BCG dans les pays d'endémie lépreuse, au point de vue prophylaxie de la maladie de Hansen, sont à l'ordre du jour. Nous préconisons cette vaccination [1] : elle est vraiment bénigne et il n'y a rien à perdre à la pratiquer dans de telles conditions.

L'étude de cette question est dominée par celle des rapports immunologiques entre lèpre et tuberculose. Nous les avons précédemment étudiés, notamment en pratiquant des réactions concomitantes de Mitsuda et de Von Pirquet chez 128 enfants de l'Ecole Marchoux et du Dispensaire B de Cayenne, enfants âgés de 6 à 14 ans et atteints de lèpre tuberculoïde, au nombre de 43, ou indifférenciée, au nombre de 85.

Nous concluons de cette étude [2] :

« Nous dirons quant à nous, à la lumière de nos résultats, que si le bacille de Koch est capable de faire naître un état de para-allergie vis-à-vis du bacille de Hansen, l'inverse est loin d'être la règle générale. Ceci n'est d'ailleurs pas pour nous étonner, car le pouvoir pathogène intrinsèque du bacille de Hansen est indiscutablement inférieur à celui du bacille de Koch ; il ne produit, selon l'opinion généralement admise, rien d'ana-

logue à la tuberculine, agent habituel de la détection de l'allergie tuberculeuse dans un organisme ; l'allergie lépreuse est décelée principalement (R. de Mitsuda) à l'aide de corps microbiens et non à l'aide de produits de métabolisme, plus ou moins toxiques » [3].

Et nous soulignons que pour pouvoir comparer plus justement entre elles les réactions organiques à des antigènes lépreux et à des antigènes tuberculeux, il serait nécessaire d'utiliser des antigènes plus semblables entre eux que ne le sont la tuberculine (en cuti-réaction) et l'antigène de Mitsuda (en intradermo-réaction), ce que Rabello a déjà fait remarquer [4].

C'est ce que nous avons voulu faire tout en étendant notre enquête, cette fois, à des malades lépromateux, en règle générale, anergiques à la lépromine, on le sait.

Comme antigène nous avons utilisé la lépromine préparée suivant la méthode classique de Hayashi, mais diluée au 1/750 au lieu de 1/30 ; ceci nous permit d'économiser notre antigène, divers essais que nous avons effectués auparavant nous ayant montré que la dilution à 1/750 n'apportait guère plus d'atténuation aux réponses positives que des dilutions bien moindres, au 1/100 par exemple, mais aussi d'obtenir un antigène lépreux et un antigène tuberculeux, donnant des résultats aussi analogues que possible comme intensité. Ceux fournis par la lépromine au 1/750 peuvent être rapportés facilement à ceux que donne la lépromine au 1/30 si l'on veut considérer que la réponse de celle-ci serait d'un degré (d'une croix) seulement supérieure.

Notre antigène tuberculeux fut une suspension de BCG desséché vivant (ampoules de 150 mg de BCG provenant de l'Institut Pasteur de Paris et destinées à la vaccination antituberculeuse par scarification) diluée pour obtenir approximativement, par champ microscopique, le même nombre d'organismes acidorésistants qu'on en décelait dans notre lépromine au 1/750. Pratiquement cet antigène tuberculeux fut préparé comme suit : 2 cm³ d'eau physiologique furent ajoutés à une ampoule de 5 doses de BCG pour scarification ; cette suspension fut alors diluée elle-même au 1/750, puis subit exactement le traitement de l'antigène lépreux dans la méthode de préparation de la lépromine de Hayashi (suspension chauffée une heure au bain-marie bouillant et phéniquée à 0,5 p. 100).

Nous avons fait la lecture précoce (test de Fernandez) et la lecture tardive (test de Mitsuda).

La première de ces lectures nous a donné bien des résultats difficiles à interpréter avec l'antigène lépreux, mais, à l'opposé, très nets d'ordinaire avec l'antigène tuberculeux. Dans les deux cas la réaction commence en général au bout de vingt-quatre

heures, mais alors que le test de Fernandez a son maximum d'intensité à la quarante-huitième ou à la soixantième heure et a disparu avant une semaine, la réponse précoce au BCG tué poursuit son évolution, comme nous allons le voir.

La seconde lecture fut aisée avec chaque antigène. Il nous a paru cependant que la positivité maximum de la réponse à l'antigène tuberculeux se manifeste plus tôt que celle à l'antigène lépreux, chez le même malade. Le maximum d'intensité se place vers le quinzième jour pour le premier antigène, ce qui correspond aux constatations de Chaussinand [5], tandis que le trentième jour est une époque de choix pour la lecture du Mitsuda. La lecture des deux tests peut en réalité se faire au vingt-deuxième jour, ce qui simplifie le problème.

En raison de la dilution des antigènes et pour faciliter les comparaisons, les quelques résultats douteux enregistrés ont été comptés positifs.

En dehors de toute question de pourcentage de résultats positifs chez les lépreux bénins (tuberculoïdes et indifférenciés), la concordance des réponses était frappante non seulement, disons-nous, dans la négativité ou à la positivité, mais même encore dans le degré de cette dernière. Peut-être que dans l'ensemble la réaction à l'antigène tuberculeux parut-elle légèrement plus forte, mais il s'agit là de nuances, le premier fait frappant étant le parallélisme de l'intensité des réponses aux deux antigènes chez les malades répondant positivement à la lépromine. Par contre, chez les lépromateux, assez souvent, l'intradermo-réaction au BCG aboutit à une ulcération, alors que le test de Mitsuda restait évidemment négatif.

Les malades atteints de lèpre tuberculoïde et de lèpre indifférenciée étaient pour la plupart des enfants de l'Ecole Marchoux et du Dispensaire B de Cayenne, comme précédemment. Les lépromateux étaient, eux, en majorité, des malades de la Léproserie de la Désirade et du Dispensaire de Cayenne (*).

Les résultats que nous avons enregistrés sont résumés dans les tableaux I et II.

Ces tableaux montrent qu'en règle générale, l'intradermo-réaction au BCG est positive chez les tuberculoïdes : 44 cas sur 46 (96 p. 100), comme l'est la réaction de Mitsuda : 41 cas sur 46 (90 p. 100). Chez les indifférenciés nous trouvons 43 réactions positives au BCG sur 58 malades (74 p. 100) et 34 réactions de Mitsuda positives (59 p. 100).

(*) Nous remercions le Dr J. Penneck qui a bien voulu nous communiquer les résultats qu'il a obtenus chez ses malades à la Désirade à l'aide de nos deux antigènes.

TABLEAU I.

	NOMBRE de malades	MITSUDA		BCG	
		+	—	+	—
Lépromateux	40	2	38	28	12
Indifférenciés	58	34	24	43	15
Tuberculoïdes	46	41	5	42	4
Totaux	144	77	67	113	31

TABLEAU II.

	MITSUDA — BCG +	MITSUDA + BCG +	MITSUDA — BCG —	MITSUDA + BCG —	TOTAL
Lépromateux	12	2	26	»	40
Indifférenciés	14	33	10	1	58
Tuberculoïdes	2	43	1	»	46
Totaux	28	78	37	1	144

Les concordances sont satisfaisantes dans l'ensemble dans ces deux groupes de malades. En effet, nous en relevons :

Quarante-trois (soit dans 95 p. 100 des cas) pour les tuberculoïdes, dont 41 concordances positives (soit 89 p. 100), les plus importantes évidemment dans ce cas particulier où la réaction de Mitsuda est d'ordinaire positive ;

Quarante-six concordances, soit 81 p. 100 chez les indifférenciés, pour plus des deux tiers concordances positives, mais pour un tiers concordances négatives, chiffres qui ne sont guère étonnants puisque, on le sait, la réaction de Mitsuda est souvent négative chez les indifférenciés. Chez ces malades la discordance est la même que chez les lépromateux : il s'agit à peu près uniquement alors de Mitsuda — BCG +.

Les concordances sont rares (14 cas sur 40, soit 35 p. 100 seulement) chez les lépromateux où, comme il est classique, la réaction de Mitsuda donne fort peu de réactions positives (2 sur 40) mais où nous trouvons 28 réactions positives, soit 70 p. 100, au BCG. La règle dans la discordance est ici aussi Mitsuda — BCG +.

Ces derniers chiffres prouvent indiscutablement que toute réaction positive au BCG n'entraîne pas *ipso facto* une réaction

positive au bacille de Hansen, c'est-à-dire une réaction positive de Mitsuda.

Une réaction d'allergie à la tuberculose est reconnue pratiquement comme le témoin d'une certaine immunité contre cette affection ; de cette conception découle la vaccination antituberculeuse et le contrôle de cette vaccination, comme l'a encore souligné récemment van Deinse [6].

La vaccination par le BCG entraîne en même temps une réaction d'allergie vis-à-vis des antigènes tuberculeux et une réaction de Mitsuda positive à l'introduction des antigènes lépreux, comme nous venons encore de le constater chez une centaine d'enfants vaccinés au BCG ; cette concomitance est due évidemment à une communauté antigénique du B. H. et du B. K. qui, comme toutes les bactéries, sont des « mosaïques d'antigènes ». Dharmendra [7] a, par exemple, isolé des bacilles de Hansen plusieurs fractions antigéniques : une nucléoprotéine, une protéine alcool-soluble et une protéine acido-soluble. Certains de ces antigènes (avec probablement des composés lipoidiques) sont communs, semble-t-il, à plusieurs mycobactéries et peuvent en conséquence provoquer des réactions d'allergie croisée.

Il est patent que l'on considère en général qu'un malade qui a une réaction de Mitsuda positive est résistant à l'infection lépreuse, au contraire de celui qui est Mitsuda négatif. La constatation de la positivité constante de cette réaction dans les formes tuberculoïdes et celle de sa négativité dans les formes lépromateuses appuie fortement cette manière d'envisager les choses. L'allergie est le témoin d'une immunité partielle ; l'anergie est le témoin d'une réceptivité.

Nous avons déjà écrit à ce sujet [4] :

« Quoiqu'il ne soit pas obligatoire que la para-allergie soit, comme l'allergie, accompagnée d'immunité relative, il est tout de même permis de l'espérer, car ces réactions de l'organisme sont bien voisines et intriquées ; dès lors, comme nous l'avons souligné à la séance du 30 janvier dernier (janvier 1948) à la Commission consultative de la Lèpre au Ministère de la France d'Outre-Mer, la vaccination antituberculeuse par le BCG est susceptible de nous permettre de réaliser la transformation (au moins dans l'organisme neuf) de réactions de Mitsuda négatives en réactions de Mitsuda para-allergiques positives, ce qui peut être intéressant dans les pays de forte endémicité lépreuse. » Chaussinand est du même avis [8].

On sait que la réaction d'allergie à la tuberculine disparaît dans la tuberculose lorsque l'organisme abandonne tout combat ; n'est-ce pas là exactement ce qui se passe vis-à-vis du B. H. chez les lépromateux ? Pour nous, la réaction de Mitsuda et l'intra-dermo-réaction au BCG ont exactement le même sens biologique :

il s'agit bien de réactions d'allergie, l'une au bacille de Hansen, l'autre au bacille de Koch.

Les résultats enregistrés dans notre première « série » de 128 enfants (43 tuberculoïdes et 85 indifférenciés) ont été analogues à ceux rapportés aujourd'hui quant au Mitsuda qui nous avait donné 93 p. 100 de résultats positifs chez les tuberculoïdes et 45 p. 100 chez les indifférenciés.

Mais nous avons alors recherché l'allergie tuberculeuse à l'aide de la très peu sensible réaction de von Pirquet et nous avons trouvé les chiffres suivants : 39 p. 100 de positivité dans le groupe tuberculoïde, 13 p. 100 seulement chez les indifférenciés. Ces chiffres ne correspondent aucunement à ceux que nous relevons cette année dans les mêmes catégories de malades (presque tous, comme la première fois, enfants de 6 à 14 ans). L'utilisation d'une émulsion de BCG comme antigène nous a donné chez les tuberculoïdes des résultats se rapprochant bien plus de ceux de la réaction de Mitsuda.

La recherche de l'allergie tuberculeuse donne des pourcentages de résultats positifs de plus en plus importants et de plus en plus analogues à ceux obtenus par la réaction de Mitsuda (dans les cas de lépromino-réaction positive) lorsque la technique de cette recherche se rapproche de plus en plus de celle de la recherche de l'allergie lépreuse par la réaction de Mitsuda : mode d'administration de l'antigène et caractéristiques de celui-ci.

C'est ainsi qu'on peut considérer que la cuti-réaction à la tuberculine (réaction de von Pirquet), puis l'intradermo-réaction à la tuberculine (réaction de Mantoux), enfin l'intradermo-réaction au BCG (telle que nous venons de la pratiquer) se rapprochent logiquement de plus en plus de la pratique du test de Mitsuda.

Effectivement, les résultats obtenus par nous-même et d'autres auteurs confirment cette façon de voir les choses :

Sur 128 enfants testés (réaction de von Pirquet et réaction de Mitsuda) nous avons trouvé 25 allergiques à la tuberculose et 79 allergiques à la lèpre ; rapport :

$$\frac{\text{allergie tuberculeuse}}{\text{allergie lépreuse}} = 0,30.$$

Sur 185 enfants, N. de Souza Campos, J. Rosemberg et J. N. Aun (réaction de Mantoux et réaction de Mitsuda) ont trouvé [9] : 45 allergiques à la tuberculose et 129 allergiques à la lèpre ; rapport :

$$\frac{\text{allergie tuberculeuse}}{\text{allergie lépreuse}} = 0,35.$$

Cette fois, sur 104 malades (la plupart des enfants) testés par

intradermo-réaction au BCG et intradermo-réaction de Mitsuda, nous avons trouvé 85 allergiques à la tuberculose contre 75 allergiques à la lèpre ; rapport :

$$\frac{\text{allergie tuberculeuse}}{\text{allergie lépreuse}} = 1,15.$$

En réalité, il existe une cause d'erreur qui explique ce rapport supérieur à l'unité. Lorsqu'il y a réponse discordante chez des indifférenciés, il s'agit presque toujours, nous l'avons vu, de réaction d'allergie à la tuberculose et de réaction de Mitsuda négatives. En ne tenant compte, pour limiter cette cause d'erreur, que de nos lépreux tuberculoïdes, nous obtenons un rapport pratiquement égal à l'unité puisque pour 42 intradermo-réactions positives au BCG, nous trouvons 41 réactions de Mitsuda positives.

Si l'on considère maintenant tous les malades Mitsuda positif, quelle que soit la forme de leur maladie, nous ne trouvons qu'une discordance sur 79 cas.

Ces résultats soulignent donc bien l'intérêt qu'il y a à comparer les tests d'allergie à la lèpre et à la tuberculose avec des antigènes aussi voisins que possible et des voies d'introduction semblables.

La concordance des résultats obtenus que nous relevons entre notre premier groupe (enfants atteints de forme bénigne, indifférenciés ou tuberculoïdes) et celui de Souza Campos et collaborateurs (enfants sains), tend, par ailleurs, pour nous, à prouver que la réaction de Mitsuda chez les malades et chez les contacts sains a la même signification.

Il nous faut cependant signaler une différence dans l'aspect des réponses positives que nous avons obtenues avec l'antigène de Mitsuda et avec l'antigène BCG. Alors que la réponse à l'antigène lépreux se manifeste tardivement (en dehors de la réaction fugace de Fernandez que nous avons trouvée difficile à lire en Guyane), la réaction au BCG est très nette dans les quarante-huit premières heures, plus facile à lire souvent que ne l'est la cuti-réaction à la tuberculine à ce moment ; ensuite la réponse reste positive pour atteindre son maximum, nous l'avons vu, vers le quinzième jour.

Peut-on affirmer que les deux réactions sont de nature différente, l'une étant une réaction d'allergie, l'autre d'immunité, comme le soutiennent Souza Campos, Rosenberg et Aun ? Nous ne le pensons pas. D'ailleurs, dans la tuberculose elle-même, la question des rapports entre allergie et immunité, pourtant étudiée à fond, est loin d'être résolue et reste quelque peu mystérieuse.

Pour nous, la réaction de Mitsuda et l'intradermo-réaction au BCG dans la lèpre sont des réactions organiques semblables.

Le Fernandez correspond à la réaction intradermo-BCG des

quarante-huit premières heures ; l'intensité différente provient de la présence de fractions antigéniques solubles bien plus abondantes dans l'antigène tuberculeux que dans l'antigène lépreux.

Les endoprotéines et antigènes divers des corps microbiens eux-mêmes sont plus rapidement libérés dans les cas du B. K. que dans celui du B. H. ; dans l'intradermo-réaction au BCG il y a libération très rapide d'antigènes endomicrobiens avant la disparition de ceux qui sont déjà solubilisés ; dans l'intradermo-réaction de Mitsuda, les antigènes solubles sont fort peu abondants, la réaction précoce est faible et fugace, et ce n'est que bien après leur disparition que seront libérés les antigènes endomicrobiens ; c'est pourquoi nous constatons une discontinuité entre la réponse précoce et la réponse tardive des organismes lépreux.

Il n'y a, entre la réaction d'allergie à la tuberculose et la réaction d'allergie à la lèpre telles que nous les avons pratiquées avec les antigènes microbiens de préparations semblables, que des différences apparentes dues d'une part, répétons-le, à la très faible quantité d'antigènes solubles dans l'antigène de Mitsuda et, d'autre part, à la destruction plus rapide *in vivo* des corps microbiens du B. K. que de ceux du B. H. tués suivant la technique de Hayashi. La résistance plus grande à la destruction *in vivo* des corps microbiens du bacille de Hansen se retrouve d'ailleurs lorsqu'il s'agit de B. H. « bactériostasés » par les sulfones, B. H. qui, on le sait, demandent fort longtemps pour disparaître des tissus. Dans le même ordre d'idées, rappelons que la longue persistance d'une mycobactérie injectée à la *Galleria* a pu paraître caractéristique du bacille de Hansen.

Les résultats que nous avons enregistrés chez les lépreux tuberculoïdes avec l'antigène tuberculeux microbien et l'antigène de Mitsuda, concordance pratiquement complète, paraissent s'opposer aux constatations de Rotberg et Bechelli qui trouvent, avec la tuberculine, beaucoup moins de réactions positives qu'au Mitsuda [10], comme encore à nos conclusions précédentes [2] : en effet, nos résultats actuels prouvent que le B. H. provoque, lui aussi, une allergie croisée avec le B. K., mais il faut bien dire « au B. K. » et non « aux tuberculines » ; B. H. et B. K. provoquent, chacun vis-à-vis de l'autre, des phénomènes d'hypersensibilisation croisée par des parties communes antigéniques.

Mais dans le B. K. existe d'autres antigènes que ceux qu'il a de communs avec le B. H. Chez un individu aux défenses intactes, l'hypersensibilisation créée par l'un de ces deux germes, grâce à leur partie commune antigénique, se manifeste par des réponses au Mitsuda et à l'intradermo-réaction BCG positives. C'est ce qui se passe chez les lépreux tuberculoïdes et chez les tuberculeux latents ou vaccinés au BCG. Par contre, quand

l'organisme abandonne toute défense devant le B. H., — c'est le cas des lépromateux par exemple, — il ne répond à aucun des antigènes du bacille lépreux, aussi la réaction de Mitsuda est-elle négative ; cet organisme ne réagit pas non plus alors aux antigènes que le B. K. a de communs avec le B. H., mais il peut fort bien répondre, par contre, aux autres antigènes tuberculeux, que ceux-ci soient endogènes ou exogènes (tuberculine notamment), d'où la dissociation possible chez les lépromateux ; il suffit, pour cela — condition nécessaire, semble-t-il — que l'organisme ait été préalablement sensibilisé aux fractions antigéniques spécifiques du B. K. par le B. K. lui-même, hypersensibilisation qu'il n'a aucune raison de perdre.

Entre bacille de Koch et bacille de Hansen, il ne peut être question que de para-allergie et de para-immunité partielle croisées plus importantes lorsque l'antigène est le B. K. que lorsque c'est le B. H. qui joue ce rôle.

La para-immunité que le BCG crée vraisemblablement vis-à-vis du bacille de Hansen est signée en général pour les réactions de Fernandez et de Mitsuda positives, réactions d'allergie. Cette para-immunité, aussi imparfaite soit-elle, peut jouer un rôle déterminant dans l'évolution de la lèpre dans un organisme donné en le conduisant à une forme « bénigne » de l'affection ; de là, la conception d'une prophylaxie active de la maladie de Hansen se comprend sans effort.

RÉSUMÉ-CONCLUSION.

La question de la valeur prophylactique antilépreuse de la vaccination par le BCG est dominée par celle des rapports immunologiques lèpre-tuberculose.

Pour préciser ceux-ci, il est nécessaire d'utiliser, des deux côtés, des antigènes microbiens aussi identiques que possible et des voies d'introduction semblables.

Nous avons préparé un antigène tuberculeux à base de BCG en suivant la technique de préparation de Hayashi. Cet antigène contenait approximativement autant de corps microbiens par champ microscopique qu'un antigène de Mitsuda dilué au 1/750 au lieu de 1/30.

Nous avons utilisé ces antigènes chez 144 malades : 40 lépromateux, 58 indifférenciés et 46 tuberculoïdes.

Chez les tuberculoïdes, la concordance des réponses aux deux antigènes est excellente. Elle est presque parfaite lorsqu'on considère les malades Mitsuda + quelle que soit la forme de l'affection de ces malades : une seule discordance sur 79 cas (98,70 p. 100 de concordances).

Les discordances sont bien plus fréquentes dans les cas de

Mitsuda négatif ; ici, notamment, chez les lépromateux, l'intradermo-réaction au BCG est fréquemment positive. La règle des discordances est Mitsuda — BCG +.

B. H. et B. K. sont formés de mosaïques d'antigènes. Les fractions antigéniques communes provoquent les concordances positives Mitsuda et intradermo-BCG. Les réponses sont de plus en plus concordantes, toujours dans les cas Mitsuda + lorsqu'on utilise un antigène tuberculeux de plus en plus proche de celui de Mitsuda et qu'on emploie la même voie intradermique d'introduction.

Nous ne pensons pas, comme Souza Campos, que la réaction de Mitsuda est de nature différente de celle des réactions de l'allergie tuberculeuse.

Pour nous il y a, dans les deux cas, une réaction précoce et une réaction tardive ; la première est due aux fractions antigéniques solubilisées dans l'antigène injecté, la seconde aux fractions antigéniques libérées par la destruction *in vivo* de corps microbiens.

Dans l'antigène tuberculeux, il y a beaucoup plus de fractions antigéniques présolubilisées que dans l'antigène de Mitsuda, d'où une réaction précoce plus intense dans le premier cas. En outre, les corps microbiens du bacille tuberculeux se détruisent plus vite dans l'organisme, libérant les fractions antigéniques endomicrobiennes, que ne le fait le bacille de Hansen qui, on le sait, est très résistant *in vivo* (tué, « bactériostasé » ou vivant).

De ceci il résulte qu'il n'y a aucune discontinuité entre la réaction précoce et la réaction tardive aux antigènes tuberculeux microbiens ; le contraire est observé dans le cas d'antigènes lépreux.

Le test de Mitsuda et le test de Fernandez sont des tests d'allergie lépreuse, comme les réactions de von Pirquet et de Mantoux, et l'intradermo-réaction au BCG tué sont des tests d'allergie tuberculeuse.

Il nous paraît aussi que la signification de la réponse au test de Mitsuda chez les contacts sains et chez les malades est la même.

En outre, le bacille de Koch est capable de faire naître un état de para-allergie vis-à-vis du B. H. et, inversement, le B. H. vis-à-vis du B. K., à un moindre degré cependant. Mais cette allergie au B. K. doit être recherchée à l'aide d'antigènes microbiens et non avec des produits de métabolisme comme la tuberculine. Pour nous, la réaction de Fernandez est causée par des antigènes solubles différents des antigènes endomicrobiens provoquant la réaction tardive de Mitsuda.

Bacille de Koch et bacille de Hansen (mais surtout le premier vis-à-vis du second) peuvent créer entre eux des réactions croisées

d'allergie et d'immunité partielle, para-allergie et para-immunité, cette dernière pouvant jouer un rôle déterminant dans la prophylaxie de la maladie de Hansen, d'où l'utilité de la vaccination BCG chez les enfants en pays d'endémie lépreuse, en Guyane notamment.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. FLOCH et R. CAMAIN. Réaction de Mitsuda, immunité antilépreuse et vaccination par le BCG. *Publication N° 172 de l'I. P. de la Guyane*, 3 mai 1948.
- [2] H. FLOCH et P. DESTOMBES. Réactions concomitantes de Mitsuda et de von Pirquet chez les enfants atteints de lèpre tuberculoïde et indifférenciée. *Publication N° 197 de l'I. P. de la Guyane*, octobre 1949.
- [3] H. FLOCH et P. DESTOMBES. Réaction de Mitsuda et de von Pirquet. *Rev. Bras. de Leprologia*, 1950, **18**, N° 4.
- [4] RABELLO Jr. Nova observacoes sobre a infecção tuberculosa na lepra. *Rev. Bras. de Leprologia*, 1937, **5**, 465.
- [5] R. CHAUSSINAND. Une nouvelle réaction allergique dans la tuberculose. *Ces Annales*, 1947, **73**, 811.
- [6] F. VAN DEINSE. Considérations sur la valeur de la vaccination antituberculeuse par le BCG. *Ces Annales*, 1951, **81**, 126-148.
- [7] DHARMENDRA. The lepromin test. *A Review British Empire Leprosy. Relief Association*, January 1948.
- [8] R. CHAUSSINAND. Prémunition relative antilépreuse par la vaccination au BCG. *I^{er} Congrès International du BCG*, Paris, 18-23 juin 1948.
- [9] N. de SOUZA CAMPOS, J. ROSEMBERG et J. N. AUN. Da relação imunobiologica entre tuberculose e lepra. II. Da interrelação entre as raçoes, tuberculinica a leprominica em filhos de doentes de lepra. *Rev. bras. de Leprologia*, 1950, N° 3. Résumé original en français.
- [10] A. ROTBERG et L. M. BECHELLI. Tratado de Leprologia. Biologica e Pathologia, 1950, **5**. *Servicio Nacional do Lepra*. Rio-de-Janeiro.

DIMINUTION DE L'AGGLUTINABILITE VI DES BACILLES TYPHIQUES AYANT FIXÉ DES BACTÉRIOPHAGES SPÉCIFIQUES DE L'ANTIGÈNE VI

par EWALD EDLINGER et PIERRE NICOLLE (*).

(*Institut Pasteur, Service du Bactériophage et C. N.R. S.*)

Depuis longtemps on sait que les bactéries traitées par les anti-sérums homologues ne subissent pas la lyse bactériophagique. C'est à la saturation des corps bactériens par les agglutinines qu'on attribue généralement cet effet protecteur (voir la bibliographie au paragraphe « Discussion »).

La réciproque serait-elle vraie ? En imprégnant préalablement les germes par un bactériophage, supprimerait-on ou, tout au moins, diminuerait-on leur agglutinabilité spécifique ?

L'idée première du présent travail nous a été suggérée par une expérience dont notre maître Eugène Wollman, 1943 [1], quelques jours avant sa disparition, communiqua les résultats démonstratifs à l'un de nous. Il s'agissait, autant que nous croyons nous en souvenir, d'un bactériophage actif sur un bacille dysentérique.

Nous avons repris ces recherches en nous adressant aux bactéries possédant l'antigène Vi et aux bactériophages spécifiques du même antigène.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

a) CULTURES ET BACTÉRIOPHAGES. — Nous avons utilisé plusieurs cultures de *Salmonella typhi*, dans leur forme Vi : la culture « type A » de Craigie et Felix, 1947 [2], et deux autres cultures du même type : E. 51 963, E. 51 966, reçues par le Centre de Lysotypie de l'Institut Pasteur (Dr P. Nicolle).

Nous nous sommes servis également de la culture *E. coli* I, n° 2624-36, de Kauffmann, 1951 [3], antérieurement désignée sous le nom de *Salmonella coli* I (Kauffmann, 1941) [4] qui, comme on le sait, possède un antigène Vi sérologiquement identique à celui du bacille typhique.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 7 février 1952.

Les cultures-stock de ces souches étaient conservées sur milieu de Dorset, à la glacière. Au moment de l'emploi, elles étaient repiquées sur gélose inclinée. Avant chaque expérience, la richesse en antigène Vi était contrôlée par l'agglutination sur lame (agglutinabilité Vi, inagglutinabilité O) et par l'action des phages Vi spécifiques des types (lyse confluyente sans nappe continue de culture secondaire).

Les phages Vi I, II et IV, provenant du « Central Enteric Reference Laboratory and Bureau », de Londres (D^r A. Felix) et le phage Vi III qui nous avait été envoyé par le D^r Desranleau, de Montréal, ont été régénérés sur la culture de *S. typhi* « type A ». Les phages « O1 », « O2 » et « O3 » avaient été préparés à partir des 3 phages du mélange « anti-O » utilisé pour la lysotypie de *S. paratyphi* B par la méthode de Felix et Callow, 1943 [5]. La régénération des phages a été effectuée au début en eau peptonée à 3 p. 100 (peptone Uclaf) ; mais, pour quelques expériences, le milieu utilisé ne contenait plus que 0.3 p. 100 de peptone. Les phages ont été titrés par la technique dite « à la goutte », dans laquelle 1 goutte de chaque dilution, de 10^{-1} à 10^{-8} est déposée sur une plaque de gélose préalablement ensemencée avec une culture de vingt-quatre heures de *S. typhi* « type A », en eau peptonée. Pour l'agglutination directe et pour l'absorption des agglutinines, nous nous sommes servis de sérums spécifiques anti-Vi (1), préparés par l'injection au lapin de suspensions de la culture Vi Ballerup.

b) TECHNIQUE DE LA FIXATION DES PHAGES. — La fixation des phages sur les bactéries devait, de toute évidence, être aussi voisine que possible de la saturation. Ce résultat ne pouvait être obtenu qu'en faisant agir, dans un milieu favorable à la réaction, des phages de titre élevé sur des bacilles ayant gardé intégralement, ou presque, leur antigène Vi.

Pour tenter de réaliser ces conditions idéales, nous avons expérimenté successivement sur des bactéries chauffées, ou vivantes, ou tuées par le formol.

L'emploi des cultures chauffées offrait l'avantage d'éviter la multiplication bactérienne, ce qui aurait faussé les résultats ; mais il risquait d'appauvrir les germes en antigène Vi, en raison de la thermolabilité de ce facteur, aujourd'hui discutée, et de son passage, sous l'action de la chaleur, dans le liquide environnant.

En s'adressant à des bactéries vivantes, cet inconvénient disparaissait, mais pour éviter la multiplication bactérienne et la

(1) Fournis par notre collègue Le Minor, auquel nous adressons nos remerciements.

lyse bactériophagique consécutive, il était nécessaire de travailler en milieux faiblement nutritifs. Ces conditions n'étaient pas favorables cependant à l'obtention de titres bactériophagiques élevés, ni à une bonne fixation des bactériophages, en raison de la faible teneur des milieux pauvres en électrolytes et en co-facteurs de fixation. D'autre part, ces milieux pauvres étaient contraires à l'obtention d'une agglutination normale. Il fallait les compléter en électrolytes ; mais, ce faisant, une partie des corpuscules fixés étaient remis en liberté.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les bactéries tuées par le formol : on évitait ainsi la multiplication bactérienne et la lyse, et de plus, les cellules conservaient intégralement leur antigène Vi. Il était seulement nécessaire de centrifuger et de laver les bactéries avec l'eau physiologique pour éliminer toute trace de formol ; celui-ci est, comme on le sait (voir : Nicolle, 1947 [6], Nicolle et Mimica, 1947 [7]), un puissant agent d'inactivation des phages.

Une suspension très dense de bactéries (2 à 4 milliards/cm³) dans 10 cm³ d'eau distillée reçoit IV gouttes d'une préparation de formol commercial à 40 p. 100. Après un séjour de quatre heures au laboratoire on centrifuge la suspension pendant cinq minutes à 3 000 t./min. ; on élimine le surnageant ; on remet le culot en suspension dans 10 cm³ d'eau distillée ; on centrifuge à nouveau, et on additionne le culot de 10 cm³ d'eau peptonée. On fait une agglutination sur lame avec le sérum anti-Vi. Quelques gouttes de cette suspension sont mises dans un tube d'eau peptonée pour éprouver sa stérilité.

Quel que soit l'état dans lequel se trouvent les bactéries utilisées (vivantes, chauffées ou formolées), la fixation a été effectuée selon la technique suivante : à une partie de la suspension, on ajoute le lysat phagique, qu'on laisse en contact de quatre à dix-huit heures à 5° C, à 37° C ou à la température du laboratoire. Après ce temps, on centrifuge aussi bien la suspension sans phage que celle qui a été additionnée de phage ; on sépare le surnageant qu'on soumet à un titrage. Le nombre de phages libres, sachant la quantité initiale de corpuscules, nous renseigne sur le nombre des phages fixés.

c) L'AGGLUTINATION DIRECTE. — Elle a été pratiquée de la manière suivante :

Une série de dilutions de sérum anti-Vi est préparée de manière à obtenir finalement une échelle allant de 1 p. 100 à 1 p. 6 400. Chaque tube de cette série est additionné d'un volume égal d'une suspension bactérienne (série témoin). Une série semblable recevra une suspension bactérienne préalablement traitée par le phage. La densité des germes dans ces deux séries sera unifor-

mément de 500 millions par centimètre cube. La lecture est faite après deux heures de séjour à 37° C et après vingt heures de séjour au laboratoire.

d) L'ÉPREUVE DE L'ABSORPTION DES AGGLUTININES. — Felix et Pitt, 1951 [8] recommandent cette réaction tout spécialement pour l'étude de l'antigène Vi.

Les suspensions bactériennes sont diluées de façon à obtenir des densités différentes, par exemple : 2 milliards, 500 et 100 millions par centimètre cube. Le titrage des suspensions bactériennes a été effectué par numération des colonies formées par les bactéries viables et par la détermination simultanée du poids sec d'une suspension standard. Approximativement, le poids était de 13,4 mg pour $9,5 \cdot 10^9$ bactéries viables. 1 cm³ de chacune de ces suspensions, traitées ou non par le phage, reçoit 1 cm³ du sérum anti-Vi à la dilution de 1 p. 100 ou de 1 p. 200. Après un séjour d'une heure à 37° C, on centrifuge pendant cinq minutes à 3 200 t./min. et on distribue 0,5 cm³ du surnageant dans une série de tubes en doublant chaque fois la dilution avec de l'eau physiologique. Tous les tubes, ainsi qu'une série de dilutions du sérum pur reçoivent 0,5 cm³ d'une suspension bactérienne d'environ $8 \cdot 10^9$ germes par centimètre cube. La lecture se fait de la même manière que pour l'agglutination directe.

EXPÉRIENCES.

De très nombreuses expériences ont été faites de cette manière. Elles ont donné sensiblement les mêmes résultats. Nous ne mentionnerons ici qu'une expérience de chaque sorte.

a) EXPÉRIENCES D'AGGLUTINATION. — L'expérience ci-dessous a été effectuée avec des bactéries (culture *S. typhi* « type A ») tuées par le formol (fig. 1).

On voit que la dilution limite (dernière dilution de sérum donnant une agglutination nettement positive) est de 1 p. 1 600 avec la suspension bactérienne non traitée par les phages. Elle est de 1 p. 1 200 après traitement par le phage Vi I, de 1 p. 600 avec le phage Vi II, de 1 p. 1 000 avec les phages Vi III et IV. On remarquera que dans le cas des phages non Vi anti-O₁ et anti-O₃, l'agglutination se produit jusqu'à 1 p. 1 400.

Des expériences analogues ont été faites avec des germes vivants et avec les cultures de *S. typhi* 51 963 et 51 966. Les résultats ont été comparables : tandis que le sérum anti-Vi *Ballerup* a agglutiné encore les bactéries seules (témoin sans phage) à 1 p. 1 600, les bactéries ayant fixé préalablement le phage Vi II n'ont été agglutinées qu'à 1 p. 600 ; mais avec les autres phages Vi, en particulier les phages Vi III et IV, les

résultats ont été un peu différents : tantôt l'inhibition de l'agglutination a été égale à celle du phage Vi II, tantôt elle a été inférieure ; mais la diminution de l'agglutinabilité des bactéries ayant fixé le phage, quoique parfois très faible, se manifestait toujours. Notons que le sérum anti-Vi, aux dilutions employées dans ces expériences, s'est toujours montré dépourvu d'action sur les quatre phages Vi.

Lorsque, par suite de certaines circonstances expérimentales,

Bactéries 1.10 ⁹		Suspension témoin	Suspension ayant fixé les bactériophages:					
Phages:		-	Vi I	Vi II	Vi III	Vi IV	O ₁	O ₃
ajoutés		-	1,8.10 ³	4.10 ³	1,8.10 ³	8,4.10 ⁸	1,5.10 ³	6,8.10 ⁹
fixés		-	1,47.10 ³	3,1.10 ³	1,6.10 ³	7,2.10 ⁸	7,4.10 ⁸	1,6.10 ⁹
Dilutions du sérum anti-Vi	1/200	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1/400	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1/600	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++
	1/800	+++	+++	-	+++	++	+++	+++
	1/1000	+++	++	-	+	+	+++	+++
	1/1200	+++	+	-	-	-	+++	+++
	1/1400	+++	-	-	-	-	++	+++
	1/1600	++	-	-	-	-	+	+
	1/1800	+	-	-	-	-	-	-
	1/2000	-	-	-	-	-	-	-

FIG. 1. — Epreuve d'agglutination directe. *S. typhi*, type A, formolé.

Les lysats phagiques en eau peptonée sont ajoutés après titrage aux suspensions bactériennes trois heures avant l'expérience; centrifugation, titrage du surnageant. L'épreuve d'agglutination sur les bactéries du culot remises en suspension dans de l'eau physiologique.

la fixation des phages ne se produisait pas, c'est-à-dire quand le titre des phages libres restait égal au titre initial, on ne constatait pas de diminution de l'agglutinabilité. C'était le cas en l'absence d'électrolytes ou de co-facteurs, ou bien si le sérum et le phage étaient ajoutés simultanément, c'est-à-dire lorsque la fixation n'avait pas encore eu le temps de se produire (fig. 2).

Dans une autre expérience, le sérum agglutinait les bactéries vivantes de *S. typhi* « type A », seules, à 1 p. 1 600 ; les bactéries auxquelles on avait ajouté en même temps le sérum anti-Vi et le phage Vi II (par conséquent avant que la fixation ne se soit produite) étaient agglutinées à 1 p. 1 200, tandis que l'agglu-

tination restait négative même à 1 p. 600 pour les bactéries qui étaient depuis vingt-quatre heures à 4° C en contact avec le phage et qui en avaient fixé 99 p. 100.

Nous nous sommes demandé si le nombre des phages fixés pouvait avoir une influence sur les résultats. Nous avons fait quatre portions d'une suspension de bactéries formolées de 1.10^9 . Ces portions ont reçu des quantités décroissantes de phage Vi II, la première (A) 3.10^9 , la deuxième (B) 3.10^7 , la troisième (C) 3.10^5 corpuscules par centimètre cube et la quatrième (T) n'en

Suspensions traitées par :

Bactéries		non traitée	Phage Vi II avant		Phage Vi II extemporanément	
		Aggluti- nation	Aggluti- nation	Phages fixés	Aggluti- nation	Phages fixés
Dilutions du sérum anti-Vi	I/200	+++	+++	6.10^9	+++	2.10^2
	I/400	+++	+++	$4,8.10^9$	+++	2.10^3
	I/800	+++	±	$6,8.10^9$	+++	8.10^5
	I/1600	+++	—	$5,4.10^9$	++	$2,8.10^6$
	I/3200	+	—	$4,7.10^9$	±	$6,4.10^8$

FIG. 2. — *S. typhi* 51 963 (type A).

Suspensions formolées auxquelles on a ajouté 8.10^9 corpuscules bactériophages en eau peptonée. Une suspension est traitée par le phage Vi II trois heures avant l'épreuve d'agglutination et l'autre suspension, seulement au moment même de l'addition du sérum agglutinant. Le titrage des phages libres duquel on déduit par calcul le nombre des phages fixés, est fait à la fin de l'expérience d'agglutination, c'est-à-dire après 24 heures.

a pas reçu (témoin sans phage). Les résultats de la fixation et de l'agglutination ont été les suivants :

PHAGES FIXÉS...	A 2.10^9	B $2,9.10^7$	C $2,99.10^5$	T
Agglutination :				
1/400.	+++	+++	+++	+++
1/800.	+	+++	+++	+++
1/1 000.	—	+++	+++	+++
1/1 200.	—	+	++	+++
1/1 400.	—	—	++	+++
1/1 600.	—	—	—	+++
1/1 800.	—	—	—	++
1/2 000.	—	—	—	—

Donc, plus le nombre des phages fixés sur les bactéries est grand, plus l'agglutinabilité est diminuée.

Notons que les différences de l'agglutinabilité n'apparaissent que lorsque les variations dans le nombre des phages fixés sont très importantes.

b) EXPÉRIENCES DE L'ABSORPTION DES ANTICORPS. — La figure 3 résume les résultats d'une de nos expériences.

Suspensions traitées préalablement par:

	non traitée			Phage Vi I			Phage Vi II			Phage Vi IV			Témoin Aggl.
Phages fixés				$1,8.10^{10}$			$2,2.10^9$			$7,2.10^8$			-
Dilution du sérum	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	-
1/200	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1/400	-	±	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
1/800	-	-	±	+	+	+	+	+	+	-	±	+	+
1/1600	-	-	-	-	+	+	±	+	+	-	-	±	+
1/3200	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	+
1/6400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIG. 3. — Expérience d'absorption des anticorps.

Les suspensions bactériennes formolées de *S. typhi*, type A, ayant fixé ou non les phages sont diluées de manière à obtenir : a, 2 milliards, b, 500 millions et c, 100 millions par centimètre cube et sont mélangées à parties égales avec le sérum anti-Vi Ballerup au 1/100. Après séjour d'une heure à 37° C et centrifugation, on recherche le taux des agglutinines restant dans les surnageants au moyen d'une suspension nouvelle de bactérie typhique. D'autre part, on titre le taux des agglutinines du sérum non absorbé en utilisant cette suspension (Témoin Aggl.).

Le pouvoir absorbant des bactéries qui ont fixé les phages Vi I, II et IV est diminué par rapport au pouvoir absorbant des bactéries non traitées par les phages.

D'autres expériences similaires ont donné des résultats comparables. Dans une de ces expériences nous avons utilisé deux suspensions bactériennes témoin. L'une a subi le même traitement que la suspension qui a reçu le phage : après un séjour de trois

heures à 37° C, elle a été centrifugée et le culot bactérien a été remis en suspension dans l'eau physiologique. L'autre suspension témoin n'a pas été soumise à ce traitement. L'épreuve de l'absorption des anticorps, effectuée ensuite comme d'habitude, a donné les résultats suivants :

	SUSPENSION bactérienne non centrifugée p. 100			SUSPENSION bactérienne centrifugée p. 100			SUSPENSION bactérienne + phage Vi II p. 100		
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
	Anticorps absorbés.								
	100	89	75	100	75	50	75	50	12,5

a, représente 2 milliards; *b*, 400 millions; *c*, 80 millions de germes.

La centrifugation préalable d'une suspension bactérienne suffit donc à diminuer légèrement le pouvoir absorbant de celle-ci. Mais la diminution est nettement inférieure à celle que l'on observe dans le cas de la suspension traitée par le phage.

Dans une autre expérience, nous avons voulu étudier le pouvoir absorbant de *E. coli* 1 n° 2624-36 avec ou sans phage. Nous avons utilisé les suspensions de : *a*) 1 milliard, *b*) 100 millions, et *c*) 20 millions de germes. L'absorption a été la suivante :

<i>E. coli</i> p. 100			<i>E. coli</i> + PHAGE Vi II, p. 100			<i>S. typhi</i> p. 100			<i>S. typhi</i> + PHAGE Vi II, p. 100		
<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
100	96	89	96	89	75	100	75	75	75	50	50

Dans le cas d'une culture Vi appartenant à une autre espèce bactérienne, on constate, comme pour le bacille typhique, que la fixation des phages Vi s'accompagne d'une diminution du pouvoir d'absorption des agglutinines Vi.

DISCUSSION.

Le phénomène que nous avons étudié, et qui consiste en la diminution de l'agglutinabilité d'un bacille par la fixation préalable de bactériophages homologues, à notre connaissance, n'a jamais été signalé. C'est pourtant le corollaire d'un autre phéno-

mène qui est connu depuis longtemps et qui a fait l'objet de nombreux travaux : l'empêchement de la fixation du bactériophage par la saturation du bacille sensible au moyen des agglutinines spécifiques.

Peu de temps après la découverte du bactériophage, Hauduroy, 1922 [9], observe que le sérum antidysentérique, ajouté à une culture du bacille homologue, retarde la lyse bactériophagique. Le sérum détruirait, d'après lui, une substance bactérienne, en l'absence de laquelle le processus de la dissolution ne peut s'effectuer. Da Costa Cruz, 1924, 1925, 1926 [10, 11, 12, 13] confirme l'action empêchante d'un sérum antibactérien sur la lyse bactériophagique du bacille de Flexner. Totalement dénué d'action directe sur le bactériophage, ce sérum rendrait les bactéries inaptes à permettre la multiplication des corpuscules. Si l'on emploie des dilutions suffisamment étendues, il ne s'opposerait plus à une certaine multiplication. Toutefois la lyse demeurerait invisible.

Marcuse, 1925 [14], explique que l'empêchement du phénomène lytique est dû à l'absorption des agglutinines de l'antisérum sur les « récepteurs » bactériens (b. de Flexner). Le même auteur et, indépendamment de lui, Meissner, 1924 [15], avaient admis que la fixation des corpuscules bactériophages était une véritable combinaison chimique de ceux-ci avec les « récepteurs » thermostables des agglutinines. Mais l'expérience inverse, c'est-à-dire la saturation des récepteurs bactériens par les phages dans le but d'empêcher l'agglutination par le sérum antibactérien, ne serait pas réalisable, d'après Marcuse, parce que la lyse bactériophagique surviendrait à ce moment.

Bail et Okuda, 1927 [16], observent que les cultures bactériennes rendues résistantes au bactériophage présentent une agglutinabilité diminuée par rapport aux cultures sensibles, probablement par suite de la perte d'un des constituants de la cellule microbienne. D'autre part, l'addition d'un bactériophage homologue à des streptocoques hémolytiques, d'après Schwartzmann, 1927 [17], 1928 [18], modifie le comportement sérologique de ceux-ci ; elle les rend notamment hypo-agglutinables.

Tiffany et Rakieten, 1939 [19], empêchent la fixation du bactériophage sur les entérocoques en traitant ceux-ci par un sérum agglutinant. Cette action est spécifique puisque, lorsque les germes subissent une agglutination non spécifique, par exemple par le chlorure de lanthane, ils gardent la capacité de fixer normalement les phages.

Delbrück, 1945 [20], constate également qu'un sérum antibactérien mis en contact avec la suspension microbienne entrave la fixation des corpuscules bactériophages. Il propose même l'utilisation de cette propriété comme méthode de titrage rapide des anticorps agglutinants des antisérums.

Les sérums antibactériens, d'après tous les auteurs cités ci-dessus, empêchent ou retardent la lyse bactériophagique ; mais ils n'ont pas d'action inhibitrice directe sur les phages ; ils entravent seulement la fixation des corpuscules. Il s'agit d'un phénomène spécifique.

Hadley, 1926 [21], démontre le premier, notion capitale, qu'il existe une relation entre les réactions sérologiques croisées, fournies par différentes *Salmonella* (b. typhique et certains b. paratyphiques aviaires), et la sensibilité de ces germes à un même bactériophage.

Le parallélisme entre la réaction sérologique et la réaction bactériophagique est interprété par l'auteur comme la preuve d'une communauté d'antigène entre ces différentes bactéries. F. M. Burnet, 1927 [22], montre qu'un phage actif sur *S. enteritidis* agit également sur d'autres *Salmonella* qui possèdent une structure antigénique analogue ou très voisine. En 1929 [23], il isole plusieurs bactériophages qui, les uns, lysent exclusivement la forme S de *S. enteritidis* et d'autres la forme R, enfin une troisième variété, les deux formes.

Levine et Frisch, 1932-1933 [24], 1933 [25], montrent que des extraits bactériens mis en contact avec les bactériophages homologues exercent un effet inhibiteur spécifique sur l'activité lytique de ceux-ci. Les mêmes auteurs, 1934 [26], constatent que le pouvoir lytique spécifique d'un phage à l'intérieur du genre *Salmonella* est conditionné par la présence, chez les cultures sensibles, d'un certain antigène O.

Le pouvoir antiphage des extraits bactériens peut, selon Burnet, 1934 [27], être neutralisé par un antisérum.

Certains polysaccharides bactériens, dont l'existence a été prouvée dans les extraits de *Salmonella* et de *Shigella*, d'après Cough et Burnet, 1934 [28], paraissent être les facteurs déterminants des propriétés sérologiques des bactéries et de leur sensibilité aux phages. Chez les staphylocoques, Rakieten, Rakieten et Doff, 1936 [29], réussissent à précipiter la fraction inhibitrice pour les bactériophages homologues en traitant les extraits bactériens par l'antisérum. Sertic, 1937 [30], confirme avec le bacille typhique les constatations de Burnet et celles de Cough et Burnet. A. Pirie, 1940 [31], libère les phages fixés sur *B. megatherium* en hydrolysant par le lysozyme les polyosides responsables de leur fixation. Ce sont les mêmes polyosides qui, dans les extraits, sont responsables de l'inactivation des phages.

Beumer, 1940 [32], 1947 [33], par autolyse des cultures à 55°, obtient des extraits de nature polyosidique qui inhibent la lyse bactériophagique. Ces résultats sont confirmés par Guelin, 1947 a [34]. Le sérum antibactérien exerce, d'après Beumer, en agglutinant les bactéries, une action empêchante sur la fixation

du bactériophage. D'un autre côté, il neutralise l'action antagoniste des extraits bactériens sur la fixation du phage. P. Bordet, 1948 [35], et P. Bordet et Beumer, 1948 [36], montrent que le sérum antibactérien, d'une part, et les extraits bactériens, d'autre part, protègent les bactéries contre l'action antibiotique des colicines. Ils considèrent ces faits comme des répliques du phénomène de da Costa Cruz et pensent qu'ils sont dus à l'existence sur la cellule bactérienne de récepteurs appropriés déterminant la sensibilité à la fois à l'antibiotique et au bactériophage. Beumer et Quersin, 1949 *a* [37] et *b* [38], précisent que les bactéries devenues phago-résistantes sont dépourvues des récepteurs spécifiques et que, aux différents degrés de sensibilité au phage, correspondent, chez les bactéries, des teneurs variables en récepteurs spécifiques.

Ces divers travaux établissent donc d'une manière indiscutable que, parmi les facteurs probablement nombreux qui conditionnent la sensibilité des bactéries aux bactériophages, certains antigènes bactériens spécifiques jouent un rôle primordial : chacun de ces antigènes est le « récepteur » d'un phage. Ce récepteur, lorsqu'il est séparé de la cellule microbienne, comme, par exemple, dans les extraits bactériens, garde son pouvoir d'inactiver le phage. Il peut être aussi « bloqué » par les anticorps des sérums homologues. Il y a donc compétition entre le phage et les agglutinines pour l'antigène en question, que celui-ci soit encore en place ou qu'il soit à l'état libre dans les extraits.

La découverte de l'antigène Vi par Felix et Pitt, 1934 [39], est bientôt suivie de celle de bactériophages spécifiques pour cet antigène (Craigie et Brandon, 1936 [40], Scholtens, 1936 [41], Sertic et Boulgakov, 1936 [42]). Scholtens, 1937 [43], montre que les cultures Vi de *S. paratyphi* C, tuées par la chaleur, peuvent fixer les phages Vi ; mais il ne peut démontrer l'action lytique de ceux-ci sur les cultures vivantes du même genre. Nicolle, Rita et Huet, 1951 *a* [44] et *b* [45], Rita et Nicolle, 1951 [46], démontrent, au contraire, que la présence d'un antigène Vi sérologiquement identique confère aux espèces qui le possèdent (*S. typhi*, *S. paratyphi* C, *E. coli* 1 et *S. ballerup*) une sensibilité, générale ou partielle, aux bactériophages Vi. L'analogie sérologique de ces différents antigènes Vi se double donc d'une analogie physiologique. D'autre part, l'antigène Vi, libéré des cellules bactériennes par le chauffage, exerce un pouvoir inactivant sur les phages.

Puisque les agglutinines, lorsqu'elles imprègnent la cellule bactérienne, empêchent les corpuscules bactériophages de se fixer, on est en droit de se demander si le phénomène inverse ne se produirait pas : la fixation préalable des phages sur la bactérie n'entraverait-elle pas l'agglutination ?

Les résultats de nos expériences n'apportent à cette supposition qu'une confirmation partielle : dans tous les cas, nous avons observé une diminution de l'agglutinabilité directe et une absorption moindre des agglutinines d'un antisérum lorsque nous avons pratiqué la fixation préalable d'un bactériophage Vi sur les cultures Vi de *S. typhi* ou de *E. coli* 1. Cette action est sans doute spécifique puisque la fixation préalable d'un bactériophage anti-O n'a pas été suivie d'un effet analogue.

Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir une inhibition complète de l'agglutination Vi avec les bacilles traités par les phages Vi. Cela tient peut-être en premier lieu à la labilité de l'antigène Vi (pour une documentation plus complète sur cette question, voir Jude, 1950 [47]), ensuite à la facilité avec laquelle les phages fixés sur la bactérie sont remis en liberté (Puck, Garen et Cline, 1951 [48]), spécialement dans un milieu déséquilibré par défaut ou par excès d'électrolytes (Gratia, 1939 [49], Guelin, 1947 b [50]).

Dans nos expériences, certaines conditions nécessaires à la réaction des bactéries avec les anticorps étaient plutôt défavorables à l'obtention et au maintien de la fixation des corpuscules bactériophages sur les cellules bactériennes. Ces raisons, et sans doute d'autres que nous ne soupçonnons pas, ont fait que nous n'avons pu obtenir qu'une fixation assez maigre des bactériophages sur les bactéries (quelques corpuscules par cellule), alors qu'il aurait été préférable de réaliser une fixation massive, pour nous placer dans les conditions analogues à celles de l'expérience inverse.

D'autre part, on a pu constater que nos résultats varient assez notablement dans leur intensité suivant le phage considéré : le phage Vi II est celui qui produit la plus grande inhibition, tandis que le phage Vi III se montre presque inefficace. Entre ces deux extrêmes se tiennent les phages Vi I et IV.

Sauf pour des écarts considérables, de l'ordre de 10^2 , il semble n'exister qu'une correspondance relative entre le nombre des corpuscules fixés et le degré d'inhibition de l'agglutination obtenu. Cela peut être dû aux dimensions très différentes des éléments en jeu dans la réaction : les corpuscules bactériophages et les agglutinines.

Comment pouvons-nous expliquer l'inhibition partielle de l'agglutination par la fixation préalable des bactériophages sur les bactéries ?

L'hypothèse la plus vraisemblable est celle qui a été soutenue pour le phénomène inverse : récepteurs communs pour les phages et les agglutinines. On pourrait également supposer que chaque élément trouve à la surface bactérienne ses récepteurs propres, mais que la fixation du phage sur ses récepteurs empêche par

encombrement l'accès des agglutinines sur les siens, et réciproquement.

Qu'il s'agisse d'un récepteur commun ou de récepteurs distincts, ils doivent être dans les deux cas en relation avec le facteur antigénique, qui est ici l'antigène Vi. Nos expériences font apparaître une similitude fonctionnelle entre la fixation du bactériophage et le processus qui aboutit à l'agglutination bactérienne.

CONCLUSIONS.

La fixation préalable des bactériophages spécifiques de l'antigène Vi sur le bacille typhique diminue l'agglutinabilité de celui-ci par l'antisérum Vi.

De même, les bactéries ayant fixé des phages Vi absorbent moins les agglutinines d'un antisérum que les bactéries non traitées.

Ces phénomènes sont surtout manifestes avec le phage Vi II de Craigie.

Ces actions sont spécifiques : la fixation de phages « anti-O » n'entrave guère l'agglutination.

Ces résultats font apparaître une similitude fonctionnelle entre l'action des anticorps spécifiques de l'antigène Vi et celle des phages spécifiques du même antigène.

Ce travail a été effectué avec l'assistance technique de M^{lle} J. Rembert, laborantine du C. N. R. S.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. WOLLMAN. Expérience inédite, communiquée à P. Nicolle, 1943.
- [2] J. CRAIGIE et A. FELIX. *Lancet*, 1947, **252**, 823.
- [3] F. KAUFFMANN. *Enterobacteriaceae*, Einar Munksgaard, Copenhague, 1951.
- [4] F. KAUFFMANN. *Die Bakteriologie des Salmonellagruppe*, Einar Munksgaard, Copenhague, 1941.
- [5] A. FELIX et B. R. CALLOW. *Brit. Med. J.*, 1943, **2**, 127.
- [6] P. NICOLLE. *Ces Annales*, 1947, **73**, 705.
- [7] P. NICOLLE et M. MIMICA. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1072.
- [8] A. FELIX et R. M. PITT. *J. Hyg.*, 1951, **49**, 92.
- [9] P. HAUDUROY. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **87**, 966.
- [10] J. DA COSTA CRUZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **91**, 840.
- [11] J. DA COSTA CRUZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 875.
- [12] J. DA COSTA CRUZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 1006.
- [13] J. DA COSTA CRUZ. *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 1457.
- [14] K. MARCUSE. *Zeitschr. Hyg.*, 1925, **105**, 17.
- [15] G. MEISSNER. *Zentralbl. Bakt.*, I. O., 1924, **93**, 489.

- [16] O. BAIL et S. OKUDA. *Arch. Hyg.*, 1927, **92**, 251.
- [17] G. SCHWARTZMANN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1927, **25**, 227.
- [18] G. SCHWARTZMANN. *J. exp. Med.*, 1928, **47**, 151.
- [19] E. TIFFANY et M. RAKIETEN. *J. Bact.*, 1939, **37**, 333.
- [20] M. DELBRÜCK. *J. Bact.*, 1945, **50**, 137.
- [21] P. HADLEY. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1926, **23**, 443.
- [22] F. M. BURNET. *Brit. J. exp. Path.*, 1927, **8**, 121.
- [23] F. M. BURNET. *J. Path. a. Bact.*, 1929, **32**, 15.
- [24] P. LEVINE et A. W. FRISCH. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1932-1933, **30**, 933.
- [25] P. LEVINE et A. W. FRISCH. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1933, **31**, 46.
- [26] P. LEVINE et A. W. FRISCH. *J. exp. Med.*, 1934, **59**, 213.
- [27] F. M. BURNET. *J. Path. a. Bact.*, 1934, **38**, 285.
- [28] G. A. C. COUGH et F. M. BURNET. *J. Path. a. Bact.*, 1934, **38**, 301.
- [29] M. L. RAKIETEN, T. L. RAKIETEN et S. DOFF. *J. Bact.*, 1936, **32**, 505.
- [30] V. SERTIC. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 218.
- [31] A. PIRIE. *Brit. J. exp. Path.*, 1940, **21**, 125.
- [32] J. BEUMER. *Acta Biolog. Belg.*, 1940, **4**, 490.
- [33] J. BEUMER. *Rev. Belge Path. Med. exper.*, 1947, **18**, suppl., 80 p.
- [34] A. GUELIN. *Ces Annales*, 1947, **73**, 503.
- [35] P. BORDET. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 257.
- [36] P. BORDET et J. BEUMER. *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 259.
- [37] J. BEUMER et L. QUERSIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1161.
- [38] J. BEUMER et L. QUERSIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1163.
- [39] A. FELIX et R. M. PITT. *Brit. J. exp. Path.*, 1934, **15**, 346.
- [40] J. CRAIGIE et K. F. BRANDON. *J. Path. a. Bact.*, 1936, **43**, 233.
- [41] R. TH. SCHOLTENS. *J. Hyg.*, 1936, **36**, 452.
- [42] V. SERTIC et N. A. BOULGAKOV. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 35.
- [43] R. TH. SCHOLTENS. *J. Hyg.*, 1937, **37**, 315.
- [44] P. NICOLLE, G. RITA et M. HUET. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 2152.
- [45] P. NICOLLE, G. RITA et M. HUET. *Ces Annales*, 1951, **81**, 473.
- [46] G. RITA et P. NICOLLE. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 2268.
- [47] A. JUDE. *Biol. Médicale*, 1950, **39**, 1-34.
- [48] T. T. PUCK, A. GAREN et J. CLINE. *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 65.
- [49] A. GRATIA. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 62.
- [50] A. GUELIN. *Ces Annales*, 1947, **73**, 496.

SUR LES PRINCIPES DE CLASSIFICATION DES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES PAR LA MÉTHODE DES PHAGES

par R. WAHL et J. FOUACE (*).

(*Institut Pasteur.*)

Les phages des staphylocoques pathogènes, qui proviennent pour la plupart de souches lysogènes, ont un champ d'activité très large, mais des « degrés d'activité » très variés pour les diverses souches sur lesquelles ils agissent. Cela revient à dire que, dans une préparation de phages, le nombre de particules actives n'est pas le même pour chaque souche.

Il suffit d'utiliser une dilution convenable de chaque phage, « dilution critique », pour faire apparaître ces différences d'activité qui permettent souvent d'identifier une souche.

Après les premiers travaux de Fisk [3, 4] et de Williams et Timmins [10], Wilson et Atkinson [12] ont sélectionné et adapté un certain nombre de phages qu'ils ont proposé d'utiliser pour déterminer des *types* de souches. Le jeu de phages de Wilson et Atkinson, augmenté de quelques unités (phages 53 et 54 isolés par Allison, phage 68 isolé par Wahl et Lapeyre-Mensignac), a été utilisé dans le présent travail.

Dans des publications antérieures, Wahl et Lapeyre-Mensignac [6, 7] ont proposé de classer les staphylocoques en *groupes* déterminés par la méthode des phages.

Par la suite, nous avons adjoint les deux phages 53 et 54 (1) au jeu des phages utilisés auparavant. De plus, nous avons examiné un grand nombre de souches nouvelles, et nous avons eu la surprise de constater que la fréquence de certains modes de réaction aux phages était très différente de celle d'autrefois (2).

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 3 janvier 1952.

(1) Nous devons ces phages à l'amabilité de Allison et de R. E. O. Williams que nous remercions vivement.

(2) Cette différence paraît due à l'augmentation considérable du nombre des souches sécrétrices de pénicillinase. En effet, la méthode des phages nous a permis de classer le plus grand nombre de ces souches dans l'un des nouveaux groupes (caractérisés par les phages 47, 53, 54, 44, 44 A, 6 et 7). Nous y reviendrons dans une prochaine publication.

Pour ces deux raisons, nous avons été amenés à modifier et à compléter notre classification de la façon suivante :

a) Les deux groupes que nous avons respectivement caractérisés par l'attaque du phage 52 et par celle des phages 52, 52 A et 68 ont été réunis en un seul.

b) Deux nouveaux groupes ont été reconnus. L'un comprend les souches attaquées par un ou plusieurs des phages suivants : 47, 53, 54, 44, 44 A, 6, 7. Il réunit la majorité des souches sécrétrices de pénicillinase. L'autre est caractérisé par l'attaque des phages de la série 42-47. Il comprend, entre autres, des souches attaquées par le phage 47 A et que nous avons d'abord considérées comme formant un groupe autonome.

c) Le phage 68 ne joue pas, dans la nouvelle classification, le même rôle que dans l'ancienne.

d) Les groupes sont désignés par des chiffres et non, comme dans l'ancienne classification, par des lettres, ce qui fait mieux ressortir la correspondance avec certains groupes sérologiques.

Les principaux traits de cette classification ont été exposés au Congrès International de Biologie clinique de Londres en 1951 [8]. R. E. O. Williams et J. E. Rippon [41], de leur côté, tout en considérant toute classification comme prématurée, ont indiqué au même Congrès la fréquence de certaines attaques associées, qui sont dans les grandes lignes celles qui, à notre point de vue, justifient la délimitation des groupes. Les conceptions de B. Hobbs [5], de G. Wallmark [9], au contraire, sont nettement différentes des nôtres.

Il reste encore un certain nombre de souches qui ne peuvent pas être classées par la méthode que nous allons exposer, soit à cause de leurs réactions atypiques, soit parce qu'elles ne réagissent à aucun phage aux dilutions critiques. Nous savons d'ailleurs que certaines de ces dernières peuvent tout de même être identifiées par les phages non dilués.

Les deux notions fondamentales qui nous ont permis d'établir notre classification sont : la répartition des phages en quatre séries, d'après leur champ d'activité ; la distinction que nous avons établie entre phages majeurs et phages mineurs.

LES SÉRIES DE PHAGES. — Chaque série groupe les phages qui s'associent le plus fréquemment entre eux (en nombre variable suivant la souche, d'ailleurs) dans l'attaque d'une même souche. Voici la liste des phages de chaque série :

Série des phages.

1. 52, 52 A, 29, 29 A, 31.
2. 3 C, 3 A, 3 B, 51.
3. 47, 53, 54, 44, 44 A, 6, 7.
4. 42 B, 42 C, 42 D, 42 E, 47 A, 47 B, 47 C.

Enfin, le phage 68 ne trouve sa place dans aucune série, car son champ d'activité est plus étendu que celui de tous les autres phages.

Les phages de certaines séries sont très spécifiques, ceux d'autres séries le sont moins. Ces différences de spécificité jouent un rôle important dans le classement des souches.

Les trois premières séries comprennent les phages les plus spécifiques, c'est-à-dire que :

a) Les souches sensibles à un ou plusieurs phages (aux dilutions critiques) de ces séries ne sont pas très nombreuses : 18 p. 100 des souches pour la série 1, autant pour la série 2, 16 p. 100 pour la série 3.

b) Les attaques croisées entre phages de ces séries sont assez rares (13 p. 100 des souches).

La quatrième série comprend des phages moins spécifiques que ceux des trois premières. En effet :

a) Les souches sensibles à un ou plusieurs phages de cette série sont plus nombreuses que les précédentes (28 p. 100 des souches).

b) Les attaques croisées entre phages de la série 4 et ceux des trois premières séries sont plus fréquentes (20 p. 100 des souches).

Le phage 68 est le moins spécifique de tous. Son activité s'étend à 44 p. 100 des souches et 30 p. 100 de celles-ci sont sensibles en même temps à d'autres phages. Ces associations du phage 68 se font avec n'importe quels phages.

PHAGES MAJEURS ET PHAGES MINEURS. — Cette distinction ne concerne que les phages des trois premières séries. Dans chacune d'elles, certains phages que nous appelons les « phages majeurs » sont plus spécifiques que les autres. Ces derniers sont les « phages mineurs ». Les premiers sont en italique dans la liste des phages ci-dessus. Ces deux catégories se distinguent l'une de l'autre par un ensemble de caractères :

a) Les phages majeurs attaquent un plus grand nombre de souches que les phages mineurs :

Le phage 52 attaque.	14 p. 100 des souches.
52A attaque.	19 — —
3C attaque	20 — —
47 attaque	14 — —
53 attaque	24 — —
54 attaque.	17 — —

Les phages mineurs (à l'exception des phages 44 et 44 A) attaquent moins de souches que les phages majeurs : de 7 p. 100 (phage 6) à 12 p. 100 (phage 38).

Les phages 44 et 44 A attaquent 14 p. 100 des souches. Ce chiffre est exceptionnellement élevé pour des phages mineurs et leur champ d'activité se trouve donc aussi étendu que celui des phages majeurs 52 et 47. Il faut cependant remarquer qu'il l'est encore sensiblement moins que celui de tous les autres phages majeurs. Cette exception des phages 44 et 44 A est due à ce qu'ils sont moins étroitement liés aux phages majeurs de la même série (en l'espèce la série 3) que les autres phages mineurs. En particulier, ils sont assez souvent associés dans leurs attaques aux phages majeurs de la série 1. Nous reviendrons plus loin sur ce point.

Par ailleurs, les souches attaquées par un ou plusieurs phages majeurs (quelles que soient les autres attaques concomitantes) sont plus nombreuses (82 p. 100 des souches sensibles aux phages des trois premières séries) que celles qui le sont par un ou plusieurs phages mineurs (59 p. 100 de ces souches).

b) Les souches attaquées par un ou plusieurs phages majeurs, sans l'être par aucun phage mineur de la même série, sont plus nombreuses que celles qui sont attaquées par ceux-ci à l'exclusion de ceux-là (tableau I). En particulier, quand un seul phage d'une des trois premières séries attaque une souche, celui-ci est le plus souvent un phage majeur. C'est ainsi que les phages 52 A et 3 C attaquent seuls respectivement 26 p. 100 et 32 p. 100 des souches sensibles aux phages de la série correspondante, alors qu'aucun phage mineur n'attaque isolément plus de 5 p. 100 des mêmes souches.

c) Les phages majeurs donnent tous un pourcentage élevé d'attaques fortes.

52A et 3C donnent	53	p. 100 d'attaques fortes.
47 et 54 donnent	36	— — —
52 donne	33	— — —
53 donne	28	— — —

Les phages mineurs ne se comportent pas tous de la même façon à ce point de vue. La plupart des phages mineurs ne donnent que de 12 à 20 p. 100 d'attaques fortes. Mais 5 phages mineurs font exception : 3 B en donne 37 p. 100, le phage 6. 33 p. 100 et les phages 29, 31 et 51, 25 p. 100.

d) La réaction à un phage majeur est un caractère généralement plus stable que la réaction à un phage mineur. On la retrouve plus régulièrement à différents typages d'une même souche ou aux typages des souches ayant une proche parenté entre elles. Il y a cependant deux exceptions : la réaction au phage mineur 3 B est très stable, la réaction au phage majeur 53 l'est relativement peu.

On voit que c'est l'ensemble des caractères précédents qui définit les phages majeurs. Certains phages mineurs peuvent

posséder l'un ou l'autre d'entre eux ; mais les phages majeurs se distinguent nettement de ceux-ci parce qu'ils les possèdent tous simultanément.

TABLEAU 1. — **Attaques indépendantes des phages majeurs et des phages mineurs.**

	ATTAQUES par phages majeurs seulement (1) [pour 100 souches]	ATTAQUES par phages mineurs seulement (1) [pour 100 souches]
Souches attaquées par des phages de la série 1.	35	17
Souches attaquées par des phages de la série 2.	32	15
Souches attaquées par des phages de la série 3.	30	26

(1) Nous entendons par là les souches attaquées (aux dilutions critiques) par des phages majeurs de la série correspondante, sans attaque concomitante, par des phages mineurs de la même série ou par des phages mineurs, sans attaque par des phages majeurs de la série correspondante. Il n'est pas tenu compte ici des attaques croisées par des phages mineurs d'autres séries, par des phages de la série 4 et par le phage 68.

CLASSEMENT DES SOUCHES EN GROUPES.

A chaque série de phages et au phage 68, nous faisons correspondre un groupe de bactéries. Les souches de chaque groupe sont attaquées par des phages de la série correspondante. Mais il est évident que toutes les souches attaquées par des phages d'une série donnée ne peuvent pas être classées dans le groupe correspondant à cette série. En effet, deux difficultés se présentent dans la répartition des souches entre les groupes.

a) Les phages qui attaquent une même souche le font avec des intensités très inégales, et il faut décider dans quelle mesure on doit tenir compte des attaques les plus faibles ; b) beaucoup de souches sont attaquées à la fois par des phages de plusieurs séries, et il faut déterminer, dans de tels cas, quels sont les phages qui doivent servir à identifier le groupe auquel appartient la souche.

Les règles adoptées concernent donc : 1° l'interprétation des attaques faibles ; 2° la détermination, dans les divers cas d'association possibles, des phages les plus spécifiques qui doivent servir à identifier le groupe.

Nous ne nous étendrons pas ici sur l'interprétation des attaques faibles qui sera discutée dans un prochain mémoire. Nous retiendrons seulement que certaines seront considérées comme significatives et qu'on ne tiendra pas compte des autres. On déterminera

ensuite le groupe d'après les attaques significatives les *plus spécifiques*.

1° Les souches attaquées exclusivement par les phages d'une seule série sont rattachées au groupe correspondant.

2° Les souches subissant des attaques significatives de phages de plusieurs séries seront groupées comme suit :

a) En cas d'attaques significatives par un ou plusieurs phages d'une seule des trois premières séries, en association avec des phages de la quatrième, ou avec le phage 68 ; ou en association à la fois avec des phages de la quatrième série et avec le phage 68, les phages de celle des trois premières séries qui est représentée déterminent le groupe.

b) Le groupe d'une souche attaquée à la fois par des phages majeurs d'une des trois premières séries et par des phages mineurs, appartenant à une autre des trois premières séries ou aux deux autres, est déterminé par la série à laquelle correspondent les phages majeurs.

c) Le groupe d'une souche attaquée par les phages de la quatrième série et par le phage 68 est déterminé par les phages de la quatrième série.

d) Les souches attaquées par le phage 68 seul forment le dernier groupe.

La table suivante montre bien la différence de spécificité des phages utilisés et justifie la méthode de classement :

75 p. 100 des souches attaquées par des phages de la première série appartiennent au premier groupe.

76 p. 100 des souches attaquées par des phages de la deuxième série appartiennent au deuxième groupe.

69 p. 100 des souches attaquées par des phages de la troisième série appartiennent au troisième groupe.

40 p. 100 des souches attaquées par des phages de la quatrième série appartiennent au quatrième groupe.

34 p. 100 des souches attaquées par le phage 68 appartiennent au cinquième groupe.

Les trois premiers groupes comprennent donc :

1° Les souches qui sont attaquées exclusivement par un ou plusieurs phages de l'une des trois premières séries (30 p. 100 de l'ensemble des souches de ces trois groupes).

2° Les souches qui sont attaquées par un ou plusieurs phages de l'une des trois premières séries, associés à un ou plusieurs phages de la quatrième série, ou au phage 68, ou encore associés à la fois à un ou plusieurs phages de la quatrième série et au phage 68 (47 p. 100 de l'ensemble des souches de ces trois groupes). Ces 47 p. 100 se répartissent comme suit : 29 p. 100 sont attaquées par le phage 68 ; 11 p. 100 par les phages de la quatrième série et 7 p. 100 à la fois par le phage 68 et les phages de la quatrième série. Notons que les attaques du phage 68 sont

relativement plus fréquentes dans le groupe II et celles des phages de la quatrième série dans le groupe III.

3° Les souches attaquées en même temps par les phages majeurs d'une des trois premières séries (associés ou non à des phages mineurs de la même série) et par des phages mineurs d'une autre de ces séries ou des deux autres. Ces souches appartiennent au groupe correspondant à la série des phages majeurs qui les attaquent.

Ces attaques croisées entre phages majeurs et mineurs des trois premières séries sont rares (10 p. 100 des souches des trois premiers groupes). Notons que dans un bon nombre de cas, il s'agit d'une attaque des souches du groupe I par des phages mineurs de la série 3, tout particulièrement 44 et 44 A (ces phages attaquent 10 p. 100 des souches du groupe I).

C'est pourquoi les souches attaquées par des phages de la série 3 qui sont rattachées au groupe III sont relativement moins nombreuses que les souches attaquées par des phages des séries 1 et 2 qui sont rattachées respectivement au groupe correspondant (voir la table précédente).

Le quatrième groupe comprend les souches attaquées par des phages de la quatrième série, sans l'être par aucun phage des trois premières, c'est-à-dire :

a) Les souches attaquées exclusivement par un ou plusieurs phages de la quatrième série ;

b) Les souches attaquées en même temps par un ou plusieurs phages de la quatrième série et par le phage 68.

Ce groupe est moins bien individualisé que les précédents, parce qu'il est caractérisé par des attaques moins spécifiques. Il est pourtant d'un intérêt pratique certain, parce qu'il comprend, comme nous le verrons, quelques types nets et bien identifiables.

Le cinquième groupe réunit les souches attaquées exclusivement par le phage 68. On doit se demander si ce phage 68 n'est pas trop peu spécifique pour caractériser légitimement un groupe et on peut s'attendre à ce que la découverte de phages nouveaux permette de grouper ensemble certaines des souches attaquées par le phage 68 et d'autres réfractaires à tous les phages connus jusqu'ici. Par ailleurs, un assez grand nombre de souches qui ne réagissent qu'au phage 68 lors de certains typages ne montrent plus à d'autres typages aucune réaction, ou bien elles montrent des réactions associées du phage 68 et de phages de la série 4. Nous avons enfin l'intention de rechercher si la méthode des phages non dilués ne permettrait pas de rattacher à l'un ou à l'autre des quatre premiers groupes un certain nombre des souches actuellement classées dans le groupe V, comme elle nous a permis de le faire pour des souches qui ne réagissent à aucun phage aux dilutions critiques (voir plus loin).

Le groupe V est donc un groupe d'attente, peut-être provisoire. Il n'en est pas moins utile actuellement au point de vue pratique pour identifier un nombre important de souches qui, autrement, seraient confondues avec les souches totalement réfractaires.

LES SOUCHES INCLASSABLES. — Il reste quelques souches inclassables parce qu'elles sont attaquées par des phages appartenant à différentes séries, et d'égale spécificité (donc par des phages des séries 1, 2, 3).

Nous avons vu que certaines souches attaquées par des phages des trois premières séries ou de deux d'entre elles peuvent être classées dans un des trois premiers groupes, grâce à la distinction entre phages majeurs et phages mineurs. Le reliquat de souches inclassables se réduit donc à celles qui sont attaquées par des phages majeurs appartenant à des séries différentes, ou par des phages mineurs de séries différentes (dans le second cas, sans attaque de phages majeurs). Elles comprennent, en fait, deux types différents de réactions aux phages.

a) Celui des souches attaquées *par un très grand nombre de phages*, comprenant généralement des phages majeurs et mineurs des trois premières séries ou de deux d'entre elles, associés à des phages de la série 4, ou au phage 68, ou à la fois à des phages de la série 4 et au phage 68.

b) Celui des souches attaquées *par quelques phages seulement*, qui sont des phages mineurs des trois premières séries ou de deux d'entre elles.

LES SOUCHES SANS RÉACTION (AUX DILUTIONS CRITIQUES). — Un certain nombre peut être identifié par les phages non dilués et être ainsi rattaché à un des groupes précédents. Cette méthode, dans la pratique courante du typage (3), doit être réservée strictement à ces cas. Appliquée aux souches qui réagissent aux dilutions critiques, elle donnerait souvent des réactions avec presque tous les phages et celles-ci seraient impossibles à interpréter.

Rappelons que cette technique oblige à certaines précautions (phages de titres élevés et tous de même titre, comme nous l'avons précisé dans une publication antérieure) [7].

(3) Nous disons : dans la pratique courante, car il existe un cas bien précis où la méthode des phages non dilués, appliquée à des souches qui réagissent aux phages dilués, rend des services : celui où l'on veut affirmer de façon absolue l'identité de deux souches qui donnent les mêmes réactions aux dilutions critiques ; par exemple, de souches provenant de prélèvements différents chez un malade ou dans un milieu épidémique [7].

Voici la répartition des souches entre les différents groupes.

GROUPES	NOMBRE de souches p. 100
—	—
I	18
II	19
III	18
IV	10
V	12
Non typables	7
Sans réaction (aux dilutions critiques).	16

SOUS-GROUPES DES TROIS PREMIERS GROUPES.

Nous avons vu que beaucoup de souches des trois premiers groupes sont attaquées non seulement par les phages de la série caractéristique du groupe, mais aussi par d'autres phages. Parmi ceux-ci figure, entre autres, le phage 68. Celui-ci possède un champ d'activité trop étendu pour qu'on puisse l'utiliser pour des discriminations de sous-groupes. Les autres phages, au contraire, nous servent à déterminer des sous-groupes, en appliquant les mêmes règles que pour le groupe, c'est-à-dire que :

a) On ne tient compte que des attaques significatives ;

b) On détermine le sous-groupe par les plus spécifiques des attaques croisées observées sur la souche.

On voit que le groupe IV ne peut pas être divisé en sous-groupes de cette façon. Par contre, chacun des trois premiers groupes se trouve ainsi divisé en trois sous-groupes.

Sous-groupe A, comprenant les souches attaquées seulement par des phages de la série caractéristique du groupe.

Sous-groupe B comprenant : a) les souches attaquées à la fois par des phages majeurs de la série caractéristique du groupe (avec, inconstamment, des phages mineurs de la même série) et par des phages mineurs d'une autre des trois premières séries ou des deux autres ; b) les souches attaquées en outre par les phages de la série 4.

Sous-groupe C comprenant les souches attaquées en même temps par les phages de la série caractéristique du groupe et par des phages de la série 4 (mais non par des phages d'une autre des trois premières séries).

Voici la répartition des souches dans les sous-groupes (pour 100 souches de chaque groupe) :

GROUPES	SOUS-GROUPES		
	A	B	C
—	—	—	—
I	58	21	21
II	80	7	13
III	54	8	38

On voit que dans le groupe II, la proportion de souches subissant des attaques croisées (sous-groupes B et C) est beaucoup plus faible que dans les groupes I et III. Dans le groupe I, les cas d'attaques croisées par des phages mineurs des séries 2 et 3 (il s'agit, en réalité, presque exclusivement de phages mineurs de la série 3 et tout particulièrement des phages 44 et 44 A) sont aussi fréquents que les cas d'attaques croisées par des phages de la série 4 seuls. Au contraire, dans le groupe III, les cas d'attaques croisées par des phages de la série 4 sont beaucoup plus fréquents que les cas d'attaques croisées par des phages des séries 1 et 2.

TYPES.

Dans chaque groupe et sous-groupe les réactions croisées sont tellement variées que presque toutes les combinaisons paraissent possibles. Il faudrait arriver, pour décrire des types, à grouper ces combinaisons autour d'un certain nombre de schémas, dont elles pourraient être considérées comme des variantes. Chaque schéma avec ses variantes représenterait alors un type. Mais ceci est prématuré et il est actuellement impossible d'assigner un type défini à la plupart des souches.

Cependant certaines attaques isolées ou associations d'attaques reviennent assez souvent pour être notées, sans toutefois que la plupart soient assez stables pour caractériser des types définitifs.

Ce sont :

Dans le groupe I : 52 A (24 p. 100 des souches du groupe) ; 52, 52 A (12 p. 100) ; 52, 29, 29 A (chacune 5 p. 100).

Dans le groupe II : 3 C (27 p. 100) ; 3 A, 3 B, 3 C, 51 (9 p. 100) ; 3 A et 3 C, 51 (chacune 6 p. 100) ; 3 C, 3 B et 3 C-3 A (chacune 4 p. 100).

Dans le groupe III : 47, 53, 54 (8 p. 100) ; 47, 54, 44 ; 47, 53, 54, 44 (chacune 4 p. 100).

Dans le groupe IV : 47 B, 47 C ou l'un deux (52 p. 100), 47 A, 68 (20 p. 100). Cette dernière est particulièrement stable et caractéristique.

PROBLÈME DE L'ORIGINE COMMUNE DE DEUX OU PLUSIEURS SOUCHES.

Ce problème se pose pour des souches isolées dans le même milieu épidémique ou chez le même malade. Nous prendrons, pour simplifier, le cas où l'on doit comparer deux souches entre elles. Nous pensons qu'il faut tenir compte au moins autant de la spécificité des attaques que de leur nombre et de leur intensité ; en effet, pour des souches attaquées conjointement par des phages de deux ou plusieurs séries, les différences portant sur les phages les moins spécifiques (phages de la série 4 et phage 68)

ont moins de signification que celles qui concernent les phages des trois premières séries, et en particulier les phages majeurs de ces séries.

En pratique nous utilisons les critères suivants :

On peut admettre que deux souches de groupes différents n'ont presque jamais une origine commune. Les quelques exceptions concernent soit des groupes IV ou V (mais à l'exclusion des souches du type 47 A-68), soit deux souches dont l'une est du groupe V et l'autre ne réagit pas du tout. Ces exceptions tiennent au peu de spécificité du phage 68.

En ce qui concerne les souches des trois premiers groupes, on peut admettre que deux souches appartenant à des sous-groupes différents ont rarement une origine commune. Ce second principe n'est pas aussi constamment vérifié que le premier : mais il l'est dans 91 p. 100 des cas. Les cas où il ne l'est pas correspondent surtout à deux souches de même origine dont une seulement est attaquée par des phages de la série 4.

Restent les cas de deux souches du même sous-groupe (trois premiers groupes) et celui de deux souches du groupe IV.

Il faut d'abord mentionner quelques rares types vraiment caractéristiques. Le mieux défini est le type 47 A-68, et l'on peut affirmer, croyons-nous, que les souches de ce type n'ont pas d'origine commune avec les autres souches du quatrième groupe. Puis viennent les types 52-52 A, 3 A-3 B, 3 C-51 et 47-53-54-44, moins bien individualisés et ne permettant pas d'être aussi affirmatifs.

On se basera, dans le cas de deux souches du même groupe, sur quelques remarques qui sont, par ordre d'importance :

1° Les attaques fortes sont généralement plus stables que les faibles.

2° Une souche sensible à des phages d'une série réagit généralement à chaque typage à certains phages de cette série, qui ne sont pas obligatoirement tous les mêmes à chaque fois. Cette alternance peut se produire aussi bien entre deux phages majeurs qu'entre deux phages mineurs ou qu'entre un phage majeur et un phage mineur.

3° Les attaques de certains phages tendent à être plus stables que d'autres. Ce sont généralement celles des phages des trois premières séries et plus particulièrement des phages majeurs ; mais cette règle n'est nullement absolue. En effet, si l'on range les phages par ordre de stabilité décroissante de leurs attaques, on obtient la série 47 A, 3 B, 3 C, 52 A, 52, 54, 47, 44 A, 44, 42 B, 42 D, 53, etc.

Des remarques précédentes il résulte que, pour deux souches isolées dans un même milieu épidémique ou chez le même malade, et appartenant au même groupe :

1° La probabilité qu'elles aient une origine commune est mi-

nime quand elles diffèrent par des attaques fortes, nombreuses, dues à des phages dont les attaques sont généralement stables.

2° Inversement et dans les mêmes conditions, deux souches ont probablement une origine commune si elles ne diffèrent que par plusieurs attaques faibles de phages quelconques ou par une seule attaque, même forte, d'un phage dont les attaques sont peu stables (en particulier de phages de la série IV, sauf 47 A ou des phages 53 ou 68).

3° Dans les cas intermédiaires : souches différant par une seule attaque forte d'un phage dont les attaques sont stables, ou par plusieurs attaques fortes de phages à attaques peu stables, il y a doute ; et la probabilité d'une origine différente est d'autant plus grande que les attaques en question sont plus stables et plus nombreuses.

R. E. O. Williams et J. E. Rippon [41] considèrent que, dans le cas de deux souches dont l'une est attaquée fortement par deux phages qui sont (aux dilutions critiques) sans action sur l'autre, la probabilité d'une origine commune est très faible.

On voit, d'après ce qui précède, que cette règle peut rendre de grands services ; mais elle se trouve, croyons-nous, parfois en défaut parce qu'elle ne tient pas compte des différences de spécificité entre les phages.

Enfin, rappelons que dans une publication précédente [7], nous avons montré que dans certains cas on peut non seulement affirmer que deux souches ont une origine commune, mais qu'elles sont identiques. Ce sont ceux où elles donnent un tableau identique par le type avec les phages non dilués.

RÉSULTATS COMPARÉS DE LA MÉTHODE DES PHAGES ET DE L'AGGLUTINATION PAR LES SÉRUMS SPÉCIFIQUES.

On sait que les récepteurs spécifiques des phages, situés à la surface des bactéries, sont en relation étroite avec les antigènes.

Nous pensons donc qu'une classification par la méthode des phages doit être superposable à la classification sérologique.

Malheureusement, les résultats d'une comparaison sont difficiles à interpréter, notamment à cause de l'existence de réactions sérologiques croisées qui sont fréquentes, même avec les sérums dont les coagglutinines ont été absorbées. Les auteurs tels que Cowan [2], Christie et Keogh [4] ne s'accordent d'ailleurs pas sur le nombre des groupes sérologiques.

Cependant, étant donné que Wahl et Lapeyre-Mensignac [6, 7] ont déjà tenté un rapprochement entre les groupes qu'ils avaient proposés et les trois groupes sérologiques de Cowan, nous croyons utile de reprendre la comparaison en tenant compte des modifi-

cations que nous apportons maintenant à la classification par les phages.

Le tableau II montre, dans la plupart des cas, une correspondance nette entre chacun des trois premiers groupes et un certain type de réaction sérologique (4).

TABLEAU II.

GROUPES par la méthode des phages	TYPES SÉROLOGIQUES P. 100		
	I et I-II	II et II-I	I-III
I	65	10	23
II	0	100	0
III	3	0	90

Mais il faut remarquer, d'une part, que le type sérologique qui correspond à chacun de nos trois premiers groupes est souvent un type complexe, d'autre part, que les deux autres groupes de notre classification par les phages (non indiqués dans le tableau) ne correspondent à aucun type sérologique défini.

De nouvelles études des réactions sérologiques sont donc nécessaires, en particulier pour essayer de préciser la signification des réactions complexes.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° Les 24 phages utilisés pour le typage des staphylocoques peuvent être groupés en quatre séries, plus le phage 68. Les phages des trois premières sont très spécifiques. Ceux de la quatrième le sont moins. Le phage 68 l'est encore moins.

2° Dans les trois premières séries nous distinguons des phages majeurs et des phages mineurs ; les premiers étant plus spécifiques que les seconds.

3° A chaque série de phages et au phage 68, nous faisons correspondre un groupe de staphylocoques.

Les souches de chacun des quatre premiers groupes peuvent être attaquées par des phages de plusieurs séries ; mais on utilise deux principes pour déterminer le groupe : certaines attaques faibles sont négligeables ; les attaques les plus spécifiques sont déterminantes.

Le cinquième groupe est un groupe d'attente où sont réunies

(4) Les séro-agglutinations ont été faites par notre collègue Pillet, que nous remercions vivement.

les souches attaquées exclusivement par le phage 68, trop peu spécifique.

4° Chacun des trois premiers groupes est divisé en trois sous-groupes comprenant respectivement : les souches attaquées exclusivement par les phages de la série caractéristique du groupe : celles qui le sont, en outre, par des phages mineurs d'une autre série ; celles qui le sont par des phages de la série 4.

5° De rares types, surtout le type 47 A-68, sont bien individualisés.

6° Nous proposons des règles indiquant la probabilité d'origine commune de deux souches appartenant au même groupe et au même sous-groupe.

7° Une correspondance existe entre certains des groupes déterminés par la méthode des phages et certaines réactions sérologiques déterminées par les agglutinations par les sérums spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. CHRISTIE et J. KEOGH. *J. Path. a. Bact.*, 1940, **51**, 189.
- [2] S. T. COWAN. *J. Path. a. Bact.*, 1938, **46**, 31 ; 1939, **48**, 169.
- [3] R. T. FISK. *J. Infect. Dis.*, 1942, **71**, 161.
- [4] R. T. FISK et O. E. MORDWIN. *Am. J. Hyg.*, 1944, **40**, 232.
- [5] B. HOBBS. *J. Hyg.*, 1948, **46**, 222.
- [6] P. LAPEYRE-MENSIGNAC. *Thèse Fac. Pharmacie de Bordeaux*, 1950.
- [7] R. WAHL et P. LAPEYRE-MENSIGNAC. *Ces Annales*, 1950, **78**, 353 et 765.
- [8] R. WAHL. Intern. Congress of clinical Pathology, London, juillet 1951.
- [9] G. WALLMARK. *Särtryck Nordisk Medicin*, 1949, **41**, 806.
- [10] S. WILLIAMS et C. TIMMINS. *Med. J. Austr.*, 1948, **2**, 687.
- [11] R. E. O. WILLIAMS et J. E. RIPPON. Intern. Congress of Clinical Pathology, London, juillet 1951.
- [12] G. S. WILSON et T. B. ATKINSON. *Lancet*, 1946, **1**, 647.

UNE NOUVELLE MÉTHODE DE DIFFÉRENCIATION DES VARIÉTÉS DE *BRUCELLA*. ACTION DU DIÉTHYLDITHIOCARBAMATE DE SOUDE (DEDTC)

par G. RENOUX

[avec la collaboration technique de H. QUATREFAGE] (*).

(Centre FAO/OMS de Recherches sur la Fièvre Ondulante,
Montpellier.)

On sait l'intérêt, mais aussi les difficultés, de la différenciation des *Brucella* en variétés *melitensis*, *abortus* et *suis* [1, 2].

Pour éclairer le mécanisme d'action du dithioglycérol (BAL) sur les *Brucella* [3, 4, 5, 6], et plus généralement le métabolisme soufré de ces bactéries, nous étudions de nombreux corps à fonction thiol. L'un d'eux, le Diéthylldithiocarbamate de soude (DEDTC) (1) — dont nous relaterons plus tard les autres propriétés — possède, imbibant une rondelle de papier-filtre placée au centre d'une culture sur milieu solide, des actions différentes selon la variété de *Brucella* en cause, en permettant ainsi la différenciation.

Après de nombreux essais portant sur le milieu de culture (bouillon gélosé au foie [7], « potato agar » et « tryptose agar » de Difco, « trypticase soy agar » de BBL et « Albimi agar »), sur la quantité et la qualité du DEDTC et sur la duplication des résultats, nous nous sommes arrêtés à la technique suivante :

TECHNIQUE.

1° *Milieu de culture.* — « Albimi agar ». Faire fondre et répartir en boîtes de Petri de 7 cm de diamètre sous une épaisseur de 2 mm qui favorisera la diffusion en largeur du DEDTC ; une fois

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 janvier 1952.

(1) Obtenue grâce à l'obligeance du Dr P. Durand, directeur de l'Institut Pasteur de Tunis, qui l'emploie pour préparer des vaccins anti-typhoïdiques, staphylococciques, gonococciques, coquelucheux, chancre mou, fièvre aphteuse [8].

le milieu solidifié, sécher ces boîtes par un séjour de trois heures à l'étuve à 37°. Ensemencer, comme indiqué ci-après, à raison d'un échantillon par boîte.

2° *Solution de DEDTC*. — Préparer une solution aqueuse extemporanée : 1 g de DEDTC dans 100 ml d'eau distillée stérile. Cette solution s'utilise telle quelle sans stérilisation.

3° *Ensemencement des boîtes de Petri*. — A partir d'une culture de trente-six à quarante-huit heures sur milieu au foie ou « Albimi agar » (tubes de 18) des souches à éprouver, faire une suspension épaisse par dilution dans environ 4 ml d'eau salée stérile (2), étaler cette suspension sur toute la surface d'une boîte préparée en 1°, puis aspirer tout l'excès de liquide. Les boîtes, dûment étiquetées, sont alors portées à l'étuve à 37°, où elles restent ouvertes une heure pour assurer leur siccité.

4° Placer au centre de la boîte, sur la gélose ainsi ensemencée, une rondelle support du DEDTC : rondelles de 11 mm de diamètre de papier-filtre ordinaire, stérilisées au four Pasteur. Au moment de l'emploi, plonger une rondelle maniée stérilement dans la solution de DEDTC et l'essorer sur la paroi du flacon : ceci correspond à l'absorption de 0,05 ml de solution. Mettre à l'étuve à 37° les boîtes ensemencées et munies de leur rondelle : on les en sort le troisième jour pour faire la lecture.

5° *Lecture*. — Se fait dans les meilleures conditions en observant chaque boîte de Petri sur fond noir, couvercle en dessous, gélose au-dessus avec un éclairage oblique qui n'éblouisse pas l'observateur [lampe de microscope].

On voit, à travers le milieu et la paroi de verre du fond, les éléments analysés ci-dessous, qui permettent la différenciation.

RÉSULTATS.

a) Milieu seul, non ensemencé : autour de la rondelle, un halo plus transparent que le milieu lui-même, entouré d'une auréole blanche opaque suivie d'un anneau brun rougeâtre limité par un très fin cercle rouge (diamètre total, environ 34 mm).

b) *B. melitensis* : autour de la rondelle, région de culture homogène plus ou moins intense, qui peut manquer presque complètement au centre et va s'épaississant vers la périphérie ; cette zone est nettement limitée à l'extérieur par un anneau blanc opaque qui la sépare d'une large zone (3 à 4 mm) d'inhibition ou de très faible développement cultural qui tranche nettement par sa transparence sur le reste de la culture normale.

(2) Opacité comparable à deux fois celle du standard n° 1 de Mac FARLAND.

c) *B. abortus* : culture qui peut être faible autour de la rondelle, sans tendance à l'épaississement ; vers la périphérie, deux anneaux : interne mince et brun, externe blanc, séparés par une mince auréole claire. L'inhibition externe est faible dans ses dimensions (1 mm) et dans son intensité.

d) *B. suis* : inhibition (20 à 30 mm) autour de la rondelle. Cette inhibition peut n'être pas totale ; peu ou pas d'anneau entre cette région et la culture normale : quand il y en a, c'est un double

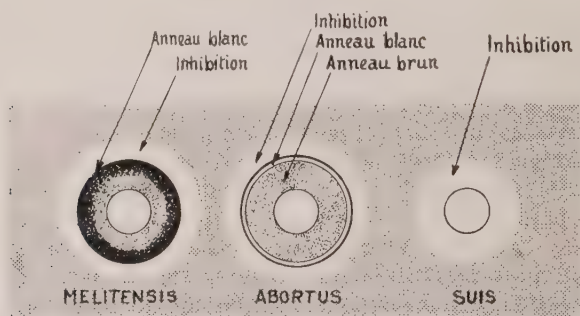


FIG. 1. — Schéma de la différenciation par le DEDTC (pour *abortus*, la flèche « anneau brun » devrait s'arrêter au cercle mince qu'elle coupe).

anneau extrêmement fin, blanchâtre dans sa partie interne, brun brique à la limite de la culture normale.

Tels sont les aspects constants à plusieurs examens de 31 souches de *Brucella* typiques aux autres épreuves d'identification [9, 10].

Ces souches sont les suivantes :

<i>Melitensis</i> , 11 souches	<i>Suis</i> , 7 souches	<i>Abortus</i> , 13 souches
L. 4 France.	S. 3 U.S.A.	B. 55 France.
H. 405 France.	S. 6 U.S.A.	B. 112 Porto-Rico.
H. 830 France.	S. 7 U.S.A.	B. 304 France.
H. 921 France.	S. 8 U.S.A.	B. 305 Israël.
H. 983 France.	S. 9 Grande-Bretagne.	B. 306 Israël.
H. 1308 Yougoslavie.	H. 1309 Yougoslavie.	B. 307 Israël.
H. 1327 Yougoslavie.	1286 Argentine.	B. 313 U.S.A.
H. 1330 France.		B. 314 U.S.A.
H. 1345 France.		B. 315 U.S.A.
H. 1346 Grande-Bretagne		B. 316 U.S.A.
1287 Argentine.		B. 317 U.S.A.
		H. 1350 Congo belge.
		« 19 » U.S.A.

D'autre part, 11 souches de *Brucella* atypiques par un ou plu-

seurs caractères classiques d'identification ont permis les résultats suivants à l'épreuve du DEDTC :

O. 88 souche ovine et H. 1187 souche humaine, sont toutes deux *melitensis*, sauf la production de SH_2 qui est importante et prolongée. Epreuve au DEDTC : *melitensis* atypiques : un seul et léger



FIG. 2. — Action du DEDTC sur *Br. melitensis*.

anneau blanc, la zone d'inhibition périphérique est faible, comparable à celle que montre *abortus* typique.

Pour ces 2 souches, les résultats de l'identification sont les mêmes par les techniques classiques ou par celle que nous décrivons ici.

H. 1348 et H. 1349, deux souches humaines du Congo belge, sont *melitensis* par leurs caractères huddlesoniens ou sérologiques : seule leur activité uréasique est faible (cinquante et trente-et-une minutes en milieu de Fergusson) comme le serait celle des *abortus* : épreuve au DEDTC : *melitensis*.

B. 308 a été isolée d'une vache en Israël ; *abortus* par son comportement vis-à-vis des colorants, elle est *melitensis* par l'absence de dégagement de SH_2 et la sérologie ; nous la classons *melitensis* par l'action du DEDTC.

L. 4 et L. 5, deux souches isolées de lièvres, sont *suis* par



FIG. 3. — Action du DEDTC sur *Br. abortus*.

l'action des colorants, ne donnent qu'un faible dégagement de SH_2 et ne sont pas agglutinées par un sérum anti-*abortus* ; épreuve au DEDTC : *melitensis*.

1288 vient d'Argentine ; cette souche, *abortus* par son comportement sur les colorants et son activité uréasique, ne donne pas de dégagement de SH_2 ; épreuve au DEDTC : *abortus*.

C. 186 a été isolée d'une chèvre en Israël ; caractères *melitensis* par les techniques de Huddleson, mais *abortus* par son activité uréasique et l'agglutination par un sérum spécifique ; épreuve au

DEDTC : *abortus* atypique car les deux anneaux sont difficiles à voir.

B. 310 et 311 ont été isolées en Israël de deux avortons de vaches vaccinées ; ces deux souches, *melitensis* par leur comportement vis-à-vis des colorants, sont *abortus* par le dégagement SH_2 et



FIG. 4. — Action du DEDTC sur *Br. suis*.

l'activité uréasique (quinze et trente-cinq minutes en milieu de Fergusson) ; épreuve au DEDTC : *abortus*.

CONCLUSIONS.

Les aspects que nous venons de décrire procèdent à la fois de réactions du DEDTC sur le milieu de culture et d'influences de ce produit sur les *Brucella*.

Quelle que soit la cause exacte du phénomène observé, cette

étude de 42 souches de *Brucella* montre que par le simple artifice de la présence d'une rondelle de papier-filtre imprégnée d'une solution fraîche de DEDTC au centre d'une boîte de milieu « Albimi agar » où cultive une *Brucella*, il est aisé, au troisième jour d'étuve à 37°, de déterminer la variété à laquelle appartient l'échantillon en expérience (3).

Les résultats obtenus sont en complète concordance pour l'identification de 31 souches typiques.

L'épreuve au DEDTC a permis le classement de 11 souches atypiques, en accord avec les renseignements épidémiologiques éventuels et avec l'identification sérologique.

Cette méthode se recommande par la simplicité des manipulations, ne demande qu'une seule lecture et économise temps et milieux de culture.

Il est facile d'acquérir l'entraînement nécessaire pour « se mettre dans l'œil » les aspects différentiels en comparant plusieurs souches sûrement connues ; on voit, de la périphérie vers la rondelle de papier :

Melitensis : large zone claire où le milieu semble transparent, un anneau blanc, une culture plus ou moins intense qui va en diminuant ;

Abortus : mince zone claire, deux anneaux (blanc puis brun), culture d'intensité égale ;

Suis : anneaux absents ou très peu visibles, inhibition qui peut être complète.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. RENOUX, L. CARRÈRE et H. QUATREFAGE, *Ass. Micr. L. Franç.*, *Ces Annales* (sous presse).
- [2] G. RENOUX, *Ces Annales*, 1952, **82** (sous presse).
- [3] G. RENOUX et J. ROUX, *Ces Annales*, 1951, **80**, 189.
- [4] G. RENOUX et J. ROUX, *Ces Annales*, 1951, **80**, 425.
- [5] G. RENOUX et J. ROUX, *Ces Annales*, 1951, **80**, 680.
- [6] G. RENOUX, *Ces Annales*, 1951, **81**, 541.
- [7] H. J. STAFSETH, *Techn. Bull. Michigan Agr. exp. Stat.*, 1920, n° 20.
- [8] P. DURAND, *Rev. Immunol.*, 1947, **41**, 70 et P. DURAND et G. CORDIER, *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 707.
- [9] I. F. HUDDLESON, *Brucellosis in man and animal*. The Commonwealth Fund ed., New-York 1943.
- [10] G. RENOUX et H. QUATREFAGE, *Ces Annales*, 1951, **80**, 182.

(3) Nous remercions très sincèrement MM. L. B. Moran, Argentine ; Vandepitte, Congo belge ; I. F. Huddleson et B. N. Carle, Etats-Unis ; H. Jacotot, France ; A. W. Stableforth, Grande-Bretagne ; I. Becker, J. Van der Hoeden et M. L. Lévi, Israël ; P. Morales Otero, Porto-Rico ; J. Skrakozic, Yougoslavie, qui ont bien voulu envoyer certaines des souches qui ont servi à cette étude.

CULTURE PROLONGÉE DU TISSU CONJONCTIF ET ÉPITHÉLIAL DES MAMMIFÈRES EN PRÉSENCE DE CORTISONE ET DE DÉSOXYCORTICOSTÉRONE

par G. BARSKI et G. DE BRION.

(Institut Pasteur. Service des Virus [D^r P. LÉPINE].)

De nombreux résultats expérimentaux et une abondante expérience clinique nous apportent, à l'heure actuelle, la certitude que les hormones de la cortico-surrénale : la désoxycorticostérone et les 11-oxycorticostéroïdes, se manifestent, en dehors de leur action métabolique générale, comme des hormones du tissu conjonctif. Sur ce plan, la désoxycorticostérone (DOC) et la 17-hydroxy 11-déhydrocorticostérone (cortisone) se comportent comme corps antagonistes : la première tend à favoriser la prolifération et l'inflammation de ce tissu, la seconde diminue ou annule cette réaction [25, 9, 30, 31].

La réceptivité locale, tissulaire aux corticostéroïdes, a été démontrée à plusieurs reprises *in vivo* : par Baker et Castor [4] au cours d'applications cutanées de la cortisone, par Jones et Meyer [20] dans la réparation des lésions cornéennes, et surtout par Shapiro, Taylor et Taubenhaus [29] qui ont obtenu un effet anti-inflammatoire strictement local avec la cortisone associée à l'essence de térébenthine. A la lumière de ces expériences, il apparaît qu'un territoire tissulaire limité est capable de répondre spécifiquement à l'application locale de la cortisone.

L'analyse de l'action tissulaire des corticostéroïdes a donc été poussée assez loin. Son mécanisme intime n'en demeurerait pas moins obscur. Il restait à décider si les cellules du tissu conjonctif elles-mêmes constituent les récepteurs spécifiques et sélectifs de l'action anti-inflammatoire de la cortisone ainsi que de l'action inverse et antagoniste, mais pareillement spécifique, de la DOC.

La solution de ce problème semble devoir être recherchée par l'étude de l'action des corticostéroïdes sur des cellules cultivées *in vitro*, et soustraites par conséquent à l'organisation complexe du territoire tissulaire dont elles font partie *in vivo*.

Dès 1945, Dorothy Heilman [17, 18] se propose de répondre à cette question. Dans les cultures de thymus elle observe une inhibition de la migration de leucocytes petits et moyens en présence de 1,25 à 50 μg de cortisone par centimètre cube de milieu. Dans les cultures de rate la cortisone, au contraire, accélère la migration des macrophages. Son effet sur les fibroblastes est plutôt inhibiteur, mais inconstant.

En 1951, Holden, Seegal et Ryby [19], en cultivant pendant quelques jours des explants de rate de souris, de cobaye et de lapin, constatent que 0,7 μg par centimètre cube de cortisone inhibe souvent la migration et la croissance fibroblastiques, surtout si le tissu provient d'animaux infectés ou immunisés avec le bacille tuberculeux.

Cornman [8], dans des cultures de courte durée, ne constate aucune action de 0,02 à 0,1 mg par centimètre cube de cortisone sur la croissance tissulaire des fragments de cœur d'embryon de souris. En revanche, la DOC, à la même concentration, détruit très rapidement et sélectivement les fibroblastes en épargnant les cellules de type épithélial étalées en nappe dans ces mêmes cultures.

Enfin, M^{lle} Barber et Delaunay [2] cultivent des fragments de rate de cobaye et de cœur d'embryon de poulet dans du plasma d'animaux traités à la cortisone ou à la DOC. Ils constatent que lorsque les doses de ces hormones et surtout de la cortisone sont très élevées et que l'état général de l'animal devient précaire, son plasma peut empêcher la migration des macrophages et la croissance des fibroblastes, cet effet n'étant d'ailleurs pas très constant.

Les résultats, partiellement contradictoires, de ces travaux n'ont pas donné, à notre avis, de réponse définitive à la question concernant l'action tissulaire directe des corticostéroïdes et leur antagonisme à ce niveau.

Pour apporter plus de lumière à ce problème, nous avons augmenté la variété des tissus cultivés (rate, rein, tissu sous-cutané), réalisé des cultures de longue durée (plusieurs semaines) et supprimé avec l'extrait embryonnaire, au moins en partie, des facteurs biochimiques incontrôlables. De plus, nous avons étudié non seulement la prolifération et la survie des tissus en culture, mais aussi leurs fonctions spécifiques : mobilisation de cellules fixes et élaboration du collagène. Enfin, nous avons examiné le comportement *in vitro* de tissus provenant des mêmes individus avant et après traitement par les corticostéroïdes. En dehors des milieux de culture additionnés de stéroïdes cristallisés, nous avons employé, comme l'ont fait Barber et Delaunay, des milieux à base de sérums prélevés chez des animaux traités à la cortisone et à la DOC.

Partie expérimentale.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

La technique de culture de tissus que nous utilisons est celle des membranes plastiques dont la mise au point détaillée a été décrite récemment [3]. Cette technique, employée précédemment surtout pour la culture des tissus embryonnaires, nous a donné ici d'excellents résultats pour la culture prolongée des tissus adultes. Elle s'est montrée particulièrement précieuse dans ce travail. En effet, elle nous a permis de modifier la composition des milieux en cours de culture, simplement et sans recourir aux repiquages. Et nous avons pu, grâce à elle, colorer des cultures *in toto*, avec des méthodes différentielles complexes comme celle de Mallory-Heidenhain.

Les tissus de lapin devant servir à l'explantation sont prélevés par biopsie (tissu sous-cutané et rate), ou résection d'organe (néphrectomie unilatérale) sur des animaux endormis au Nesdonal. Le tissu sous-cutané lâche, très riche en fibres conjonctives, est prélevé au niveau de l'abdomen. Le tissu splénique provient de la partie marginale de la rate et les fragments du tissu rénal sont prélevés dans la couche profonde de la substance corticale du rein se trouvant à la limite des pyramides de Malpighi.

Le sérum est obtenu par ponction cardiaque sans anesthésie.

Les tissus embryonnaires de souris, utilisés accessoirement, sont le foie et le poulmon.

Le milieu de culture de base pour les tissus de lapin a la composition suivante : 30 p. 100 de sérum homologue, parfois autologue, 10 p. 100 de sérum ultra-filtré de cheval, 5 p. 100 de solution de Ringer, contenant 0,05 p. 100 de Tween « 20 ». Le Tween facilite la mise en suspension et la solubilisation des stéroïdes. Le manque de toxicité de ce produit pour les tissus *in vitro* à des concentrations de cet ordre a été démontré par Morton, Morgan et Parker [22] et confirmé par nous-mêmes. Les milieux sont agités pendant trois heures avant leur utilisation dans un agitateur automatique. Nous utilisons la cortisone (acétate) cristallisée (non injectable) de Merck, l'acétate de DOC et la DOC base de Roussel et du cholestérol chimiquement pur. Aux concentrations de 0,01 mg à 0,1 mg par centimètre cube, les corticostéroïdes passent entièrement en solution dans notre milieu au bout de vingt-quatre heures.

Certains, parmi les animaux qui doivent fournir les tissus ou le sérum, sont soumis à un traitement préliminaire par les corticostéroïdes. Ce traitement consiste en trois injections intramusculaires de 25 mg de suspension d'acétate de corticostérone (Merck)

ou de solution huileuse d'acétate de DOC, espacées de vingt-quatre heures, suivies de l'injection d'une dose double qui précède de deux heures la prise de sang et le prélèvement des tissus destinés à la culture.

La durée des cultures est de deux à quatre semaines. Les renouvellements de milieu se font tous les deux ou trois jours.

Avant la coloration, les cultures sont fixées, après lavage soigné à l'eau physiologique à 37° C, au Bouin-Duboscq-Brasil. L'excès de fixateur est éliminé par lavages successifs à l'alcool à 96°, à l'eau lithinée et à l'eau distillée. Les colorations employées sont : le bleu de toluidine et, accessoirement, l'azan de Mallory-Heidenhain.

Pour la coloration vitale différentielle, qui nous sert à évaluer le degré de mobilisation des cellules fixes et leur évolution vers le type de cellule histiocyttaire, nous employons une solution à 1 : 20 000 de rouge neutre dans du Ringer et nous lisons les résultats dans les trois à dix minutes qui suivent l'introduction du colorant.

RÉSULTATS.

Nous rapportons les résultats d'observation de 1 920 cultures de différents tissus de lapin, dont la caractéristique générale de croissance *in vitro* est la suivante.

La croissance pour tous les tissus cultivés : rate, rein, tissu sous-cutané, s'amorce lentement. Au bout de quarante-huit heures, on n'observe que quelques macrophages dans les cultures de la rate, quelques histiocytes et de rares fibroblastes dans les cultures du tissu rénal ou sous-cutané. Ce n'est qu'au bout de six jours que nous nous trouvons en présence de cultures bien établies et proliférantes : ensemble macrophages-histiocytes-fibroblastes pour la rate, plages épithéliales plus ou moins abondantes pour le rein et réseau de fibroblastes, la plupart multipolaires, ceci pour le tissu sous-cutané.

Il faut attendre la fin de la deuxième semaine de culture pour voir de belles colonies fibroblastiques d'origine splénique accompagnées de nombreuses cellules libres de type histiocyttaire. Dans les cultures de rein, où l'épithélium prend à ce moment une étendue maximum, on voit bien le processus de désintégration plus ou moins prononcée de la nappe épithéliale dans la région de ses bords. De ceux-ci partent des cellules mobiles multipolaires ou étoilées, munies souvent de multiples ramifications. Ces cellules prennent très rapidement le rouge neutre et on observe facilement, avec cette coloration vitale, tous les stades intermédiaires entre les cellules épithéliales pavimenteuses fixes qui restent incolores, et les cellules qui se libèrent et prennent le colorant d'autant plus vivement qu'elles s'en éloignent davantage. Ce

phénomène de transformation de cellules fixes en cellules mobiles de type histiocytaire a été observé dans les cultures de fibrocytes par Carrel et Ebeling [5] ainsi que par Ephrussi et Hughes [13], dans les cultures du mésenchyme embryonnaire par Fauré-Frémiet et Garrault [15], dans les cultures d'entoblaste vitellin par A. Thomas [32] et enfin en cultures d'éléments musculaires par Chèvremont [7] et Dupré [12]. Nous avons constaté, quant à nous, sans d'ailleurs faire de numérations, que l'abondance de ces cellules libres, prenant rapidement le rouge neutre, est caractéristique pour les cultures d'épithélium rénal en présence de cortisone aussi bien que pour les mêmes cultures témoins sans stéroïdes ou avec cholestérol.

Les cultures du tissu sous-cutané deviennent très abondantes vers le quinzième jour, elles dépassent nettement à ce moment toutes les autres du point de vue de la croissance et présentent un enchevêtrement dense et très homogène de fibroblastes.

Les cultures témoins peuvent être facilement prolongées au delà d'un mois et ceci toujours dans un milieu dépourvu d'extrait tissulaire. Le développement de ce type de cultures, comme l'a déjà constaté depuis longtemps Parker [23], n'est pas rapide, mais l'état des éléments cellulaires reste excellent pendant une longue période. Ajoutons enfin, qu'en comparant la valeur des milieux préparés à base de sérums homologues ou autologues, nous n'avons pas constaté de différence entre ces deux catégories.

I. ACTION DIRECTE DE LA CORTISONE. — Dans les premières séries expérimentales nous employons des doses faibles de stéroïdes : 0,05 mg par centimètre cube, et nous constatons que la cortisone, à cette concentration, n'entrave pas visiblement la croissance fibroblastique ou épithéliale. Cette croissance s'apparente plutôt aux cultures remarquablement riches du milieu cholestériné qu'aux cultures un peu moins abondantes dans un milieu sans stéroïdes. Au cours de cultures qui s'étendent sur plusieurs semaines, il n'est pas possible d'établir une différence particulière entre cultures sans et avec cortisone, pas plus du point de vue morphologique que du point de vue du taux de migration et de croissance.

Nous avons répété les mêmes cultures (rate, rein, tissu sous-cutané) en présence d'une concentration de cortisone dix fois plus élevée (0,5 mg par centimètre cube). Dans ces conditions, une partie du stéroïde reste en suspension. Mais les cristaux de cortisone qu'on observe d'abord, dispersés dans toute la zone de culture, disparaissent entièrement au bout de vingt-quatre heures dans le voisinage des fragments tissulaires, vraisemblablement sous l'effet de l'action enzymatique de ces derniers. On observe parfois, avec cette concentration de cortisone, au début une

migration moins importante et un départ de culture moins rapide. Par la suite, vers le dixième jour, ces cultures deviennent à tous points de vue comparables aux cultures témoins sans stéroïdes, ou additionnées de cholestérol à la même dose. C'est seulement aux environs du quinzième ou seizième jour qu'elles commencent à montrer quelques signes de déclin. Il est à souligner que c'est surtout l'épithélium rénal qui les montre : la lame épithéliale se rétrécit, se rétracte, pour disparaître entièrement vers le vingtième jour de culture. Les fibroblastes dans les cultures de la rate et les cellules libres dans les cultures du rein, bien que diminuées en nombre, résistent mieux à l'action des fortes doses de cortisone. Nous faisons des observations analogues sur des cultures témoins de deux semaines, transférées ensuite dans un milieu contenant 0,5 mg de cortisone par centimètre cube : dix-sept jours en présence de cette hormone déterminent une disparition complète des structures épithéliales, tandis que survivent des cellules libres en bon état.

Pour les doses intermédiaires — 0,1 à 0,2 mg de cortisone par centimètre cube de milieu — employées pour la culture du tissu sous-cutané, nous établissons, par numération, que le nombre moyen de cellules émigrées au bout des trois premiers jours de culture est quelque peu inférieur par rapport au témoin. L'infériorité de migration cellulaire en présence de 0,2 mg par centimètre cube de cortisone établie séparément pour les tissus de quatre lapins différents se montre statistiquement valable. Mais cette différence ne s'accroît pas, elle s'efface plutôt, et dans les cultures de dix jours il nous est impossible de discerner celles qui ont été maintenues en milieu contenant la cortisone.

Dans les cultures du tissu rénal et splénique il n'est pas possible, au début, de distinguer du témoin les cultures avec cortisone. Ce n'est que vers la troisième semaine de culture qu'apparaissent dans ces dernières quelques signes de souffrance. Ils sont, ici encore, plus prononcés dans les cultures d'épithélium rénal.

Pour compléter ces données et, en particulier, pour mieux élucider le problème de la migration des cellules macrophagiques à partir de l'explant tissulaire en présence de cortisone, nous avons eu recours aux tissus embryonnaires de souris, le poumon et le foie. Ces tissus, explantés dans un milieu à base de sérum hétérologue, constituent, aux premiers jours de culture, une source abondante de grosses cellules mobiles, ramifiées, de type macrophagique. En présence de très fortes concentrations de cortisone (1 mg par centimètre cube, quantité qui ne se dissout que partiellement), ces formes cellulaires sont rares et subissent une dégénérescence rapide. En revanche, la croissance des fibroblastes est, les premiers jours, abondante ; les fibroblastes

prennent ici une forme particulière, ils sont très allongés et minces. Avec l'âge, la culture se transforme et, au bout de huit jours, on ne voit plus de cellules vivantes dans la zone qui entoure l'explant, zone de laquelle disparaissent également les cristaux de cortisone, mis visiblement en solution par l'activité enzymatique tissulaire. Cependant, les cultures témoins montrent une croissance tissulaire mixte où l'on observe, à côté de cellules épithéliales, toutes les formes intermédiaires entre l'histiocyte et le fibroblaste.

A des concentrations moins élevées de cortisone, 0,1 mg par centimètre cube, les résultats sont bien moins nets. Pourtant, dans une série de 80 cultures de foie embryonnaire de souris, nous avons pu dénombrer dans les cultures témoins plus de cellules migratrices et, parmi elles, plus de formes actives avec pseudopodes, que dans les cultures en présence de 0,1 mg par centimètre cube de cortisone.

II. ACTION DIRECTE DE LA DÉSOXYCORTICOSTÉRONÉ. — En présence de faibles doses d'acétate de désoxycorticostérone (DOCA), 0,05 mg par centimètre cube, les cultures de *rate et de rein* sont moins abondantes qu'en milieu témoin ou en présence de cortisone. Cette différence s'accroît au bout de dix à quinze jours. Mais il ne s'agit pas ici d'une action toxique brutale, puisque dans des cultures de rate de dix-huit à vingt jours on observe bon nombre de fibroblastes en excellent état sans signes de dégénérescence, ainsi qu'une croissance mixte d'épithélium et d'histiocytes dans les cultures parallèles de rein.

L'action spécifique de la DOCA apparaît plus nettement si nous augmentons dix fois la dose de ce produit (0,5 mg par centimètre cube). Le sixième jour de culture, tandis que le témoin sans stéroïdes, ainsi que les cultures avec cholestérol ou cortisone, à la même concentration, montrent une croissance déjà considérable, les cultures avec DOCA ne manifestent pratiquement aucune activité vitale. Mais si à ce moment on remplace dans les cultures de rate le milieu avec DOCA par un milieu témoin, la reprise de croissance, après six jours de stagnation, est rapide et vigoureuse. Nous obtenons le même effet, bien que moins flagrant, en remplaçant le milieu avec DOCA par un milieu contenant la cortisone. La même opération de changement de milieu ne donne aucun résultat dans les cultures de rein qui restent définitivement sans migration ni croissance. Un effet contraire apparaît dans les cultures maintenues pendant six jours en milieu témoin ou en présence de cholestérol ou cortisone, si on les soumet ensuite à l'action de la DOCA à 0,5 mg par centimètre cube ; les cultures s'arrêtent dans leur croissance, s'atrophient rapidement ; on voit, de plus en plus, des cellules arrondies

et agglomérées et les cultures finalement périssent. L'action de la DOCA, malgré sa concentration élevée, n'est pourtant pas brutale et le processus décrit s'étend suivant la culture sur plusieurs jours, voire une semaine. Il est à souligner que l'épithélium des cultures rénales subit la dégénérescence aussi rapidement que les fibroblastes de la rate, tandis que les cellules libres de type histiocytaire, se trouvant à la périphérie des cultures rénales, sont relativement plus réfractaires à l'action de la DOCA ; elles sont rares, mais encore en bon état dans des cultures de dix-neuf jours après treize jours d'action de la DOCA.

Les cultures maintenues précédemment en milieu cholestériné sont celles qui résistent le mieux à l'action de la DOCA, les cellules qui ont été traitées à la cortisone sont celles qui résistent le moins bien.

Pour les doses intermédiaires de DOCA, 0,1 à 0,2 mg par centimètre cube, les cultures de rate et de rein sont moins denses et moins étendues que les cultures témoins. Vers la fin de la deuxième semaine le déclin de ces cultures est manifeste.

Les explants du tissu *sous-cutané* se montrent bien moins sensibles à l'action de la DOCA. Dans les cultures de ce tissu en présence de 0,2 mg par centimètre cube de DOCA ou de DOC, bien que la migration au cours des premiers jours soit moins abondante que dans les témoins, la croissance devient, par la suite, comparable aux témoins. Vers le dixième jour seulement, elles commencent à montrer des signes de souffrance : les cultures s'appauvrissent, les étendues cellulaires se rétrécissent et, bien qu'on observe toujours des cellules normales, on voit apparaître des agglomérations de cellules arrondies qui, à la coloration par l'azan, absorbent fortement le bleu d'aniline, colorant du tissu collagène. Dans ces cultures, poursuivies en présence de DOC pendant dix-huit jours, les fibroblastes subissent une évolution vers le type de grosses cellules hypertrophiées multipolaires et amiboïdes. Ces cellules sont chargées massivement de granulations colorées en bleu après la coloration par l'azan de Mallory-Heidenhain, et certaines contiennent de nombreuses inclusions hyalines, colorées de la même façon. Les cellules avec granulations apparaissent dans les cultures avec d'autres milieux, mais en nombre très restreint et sont d'aspect moins caractéristique. Nous étudions ce phénomène en détail dans un autre travail.

D'une manière générale, la DOC affecte tous les tissus que nous cultivons d'une façon plus prononcée que la DOCA aux mêmes concentrations.

III. ACTION DIRECTE DES CORTICOSTÉROÏDES EN PRÉSENCE DE PLASMA. — Envisageant la possibilité que les corticostéroïdes ne

puissent exercer leur action spécifique tissulaire au niveau cellulaire qu'en présence du plasma sanguin complet, nous réalisons parallèlement des cultures de tissu sous-cutané en milieux à base de sérum ou de plasma additionnés de 20 unités d'héparine par centimètre cube. L'étendue et l'évolution des cultures dans les deux catégories de milieux, avec plasma ou sérum, sont, à peu de chose près, comparables. En présence de cortisone (0,2 mg par centimètre cube) on obtient de très riches cultures de trois semaines. L'action de la DOC (même concentration), moins manifeste dans les cultures avec plasma au cours de la première semaine, s'accroît ensuite et conduit à un appauvrissement progressif des cultures.

IV. ACTION COMBINÉE DE LA CORTISONE ET DE LA DOC. — Nous avons comparé l'action de 0,1 mg par centimètre cube de cortisone, l'action de la même concentration de DOC et aussi l'action de ces deux hormones (0,1 mg de cortisone + 0,1 mg de DOC par centimètre cube). Dans les cultures de rate et de rein nous ne constatons pas d'exaltation par la cortisone de l'action nocive de la DOC. Bien au contraire, la présence de la cortisone semble l'atténuer.

Par contre, dans les cultures du tissu sous-cutané, la présence de cortisone précipite leur dégénérescence.

V. CULTURE DES TISSUS DES LAPINS TRAITÉS PAR LA CORTISONE ET PAR LA DOCA. EMPLOI EN CULTURE DU SÉRUM DES ANIMAUX TRAITÉS PAR LES CORTICOSTÉROÏDES. — Des lapins, dont les tissus (rate et tissu sous-cutané) ont été prélevés par biopsie et cultivés dans une des séries précédentes, sont ensuite soumis à un traitement par la cortisone (4 lapins au total) et par la DOCA (également 4 lapins). Le tissu sous-cutané de ces lapins, en même temps que le tissu d'autres lapins témoins non traités, sont explantés dans des milieux additionnés ou non de stéroïdes ainsi que dans des milieux à base de sérums des lapins traités par les corticostéroïdes.

Nous ne constatons, dans ces cultures, aucune différence notable entre les tissus provenant des lapins normaux et les tissus que fournissent les lapins traités pendant trois jours par la cortisone ou par la désoxycorticostérone.

La migration cellulaire, pendant les trois ou quatre premiers jours de culture en présence de sérums provenant des lapins traités par la cortisone, se trouve stimulée par rapport aux témoins en sérum normal. Ceci est vrai pour les fragments de tissu sous-cutané provenant des lapins témoins ou des lapins traités à la désoxycorticostérone. Si le tissu provient des lapins

traités précédemment par la cortisone, cet effet s'efface. Les sérums des lapins traités par la DOCA se confondent par leurs propriétés avec les sérums témoins. Des cultures poursuivies pendant vingt et un jours dans ces milieux voient s'effacer entièrement les différences entre les trois groupes de sérums.

Discussion et conclusion.

Dans nos expériences, la cortisone, employée à la concentration de 0,1 mg par centimètre cube, concentration qui dépasse sans doute celles qu'on atteint dans les tissus de l'animal traité, n'affecte pas la croissance des fibroblastes. Ici nos résultats rejoignent ceux de Cornman [8], mais sont en désaccord avec les observations de Holden et coll. [19]. De même, cette hormone permet une croissance abondante de l'épithélium rénal et elle n'empêche pas la formation, à partir de cet épithélium, des cellules libres du type histiocyttaire.

D'autre part, des tissus qui ont subi *in vivo* un traitement général à la cortisone se comportent, après explantation, comme les tissus normaux.

Les effets tardifs des concentrations plus élevées de cortisone ne peuvent pas, à notre avis, être considérés comme spécifiques. Ils intéressent d'ailleurs, en première ligne, l'épithélium rénal.

De très fortes doses de cortisone suppriment entièrement la migration des gros macrophages, mais épargnent les fibroblastes en culture de poumon et de foie embryonnaires de souris, phénomène qui n'est confirmé qu'en partie avec des doses plus faibles. En outre, la migration de cellules du type histiocyte-fibroblaste à partir de fragments du tissu sous-cutané est diminuée au cours des premiers jours après explantation, en présence de 0,2 mg par centimètre cube de cortisone. Bien que nous n'ayons pas fait de numérations dans les cultures de rate et de rein, l'impression générale est que la cortisone ne défavorise pas, dans ces cultures, la migration des macrophages, ce qui est en accord avec les observations de D. Heilman [17].

Vu l'ensemble de ces faits, il serait difficile d'établir un parallélisme strict entre les résultats obtenus *in vitro* et les effets anti-inflammatoires et anti-cicatrisants observés avec la cortisone *in vivo*.

On peut affirmer seulement que, si l'action anti-fibroblastique directe de la cortisone semble exclue, il n'est pas impossible que cette hormone exerce une action inhibitrice sélective sur un autre type cellulaire, sur les leucocytes et les cellules mobiles du tissu conjonctif notamment. Rappelons à ce propos que Dougherty et

Schneebeil [41], dans une étude portant sur le rôle de la cortisone dans la régulation de l'inflammation, démontrent que le traitement par cette hormone se manifeste surtout par une diminution de l'afflux lymphocytaire et la raréfaction des macrophages qui en est la conséquence ; par contre, les fibroblastes sont épargnés et même protégés par ce traitement.

La cortisone atténue à peine l'action anticellulaire de la DOC en culture de rate et de rein. Elle l'exalte même dans le cas du tissu sous-cutané. Ce manque d'antagonisme entre les deux corticostéroïdes en culture de tissus fait, lui aussi, pencher vers un point de vue d'après lequel les effets opposés produits par ces deux hormones sont la résultante d'un mécanisme bien plus complexe qu'une interaction directe au niveau cellulaire.

Les résultats que nous obtenons avec les sérums des animaux traités par les corticostéroïdes sont différents de ceux cités par M^{lle} Barber et Delaunay [2]. Il est vrai qu'à l'opposé de ces auteurs, nous ne dépassons pas chez l'animal les limites supérieures des doses expérimentales habituelles. Mais il est curieux de constater que, dans ces conditions, la migration cellulaire (tissu sous-cutané), en présence de sérum d'animaux traités par la cortisone, se trouve exaltée au lieu d'être inhibée, comme on aurait pu s'y attendre. La composition des protéines sériques change, comme l'ont prouvé Dougherty, Chase et White [10] et aussi Bussard et coll. [4], dans les quelques heures qui suivent l'injection de l'hormone corticotrope ou les extraits corticaux, dans le sens d'une augmentation momentanée du taux des globulines. Il est probable qu'un tel changement puisse, par lui-même, influencer le taux de migration cellulaire *in vitro*. Il a été démontré, en effet [3], que la fraction macromoléculaire du sérum sanguin favorise la croissance tissulaire *in vitro*. Il n'est pas exclu que cet effet puisse masquer une action dans le sens contraire de la cortisone.

En conclusion, il faut admettre que l'action anti-inflammatoire et anti-cicatrisante de la cortisone se déroule sur un plan plus étendu que celui du système simplifié constitué par un tissu isolé soumis directement à son action.

En ce qui concerne la désoxycorticostérone, nous confirmons les résultats de Cornman [8] en montrant que l'acétate de DOC, et encore plus cette hormone sous forme de base, inhibent la croissance des fibroblastes à des concentrations de l'ordre de 0,1 mg par centimètre cube. En revanche, nous ne constatons pas que cet effet soit spécifiquement dirigé contre les fibroblastes : l'épithélium rénal est atteint au moins dans la même mesure, tandis que la croissance fibroblastique du tissu sous-cutané se montre au contraire peu affectée.

D'une manière générale, il apparaît clairement que la DOC

défavorise la croissance tissulaire *in vitro* à des concentrations qui ne sont peut-être pas loin de certaines concentrations expérimentales, voire pathologiques. Vogt (cité d'après Russel [26]) a calculé, en effet, qu'au cours de certaines expériences, comportant de fortes stimulations, la quantité d'hormones débitée par heure dans la veine surrénale est plusieurs centaines de fois plus élevée que celle que nous pouvons extraire de la glande extirpée. D'autre part, Selye [28] a démontré que la production de la DOC par une surrénale, en une minute, équivaut au contenu de 0,6 g du tissu surrénalien.

Comment expliquer, dans ces conditions, et en présence des faits cliniques et expérimentaux, les effets obtenus *in vitro*? Comment concilier la réaction prolifératrice à la DOC *in vivo* avec son effet inhibiteur, sinon cytotoxique, *in vitro*?

Nous ne possédons certainement pas encore tous les éléments nécessaires pour dénouer cette contradiction, mais, à la lumière des connaissances déjà acquises, elle ne nous semble qu'apparente.

Il faut d'abord distinguer les effets de la DOC sur les tissus *in vitro* d'une action toxique banale : nous constatons une reprise vigoureuse de la croissance fibroblastique après élimination de la DOC ; d'autre part, la survie cellulaire en présence de concentrations considérables de cette hormone est en réalité très longue, elle s'étale sur plusieurs semaines. Il s'agit donc essentiellement d'un arrêt de la prolifération normale des tissus explantés plus que d'une action franchement cytotoxique et léthale.

Comme nous le montrons ailleurs, cette atteinte des tissus *in vitro* par la DOC a un caractère particulier. Elle s'accompagne, surtout dans le cas du tissu sous-cutané, d'accumulation intracellulaire d'une substance ayant les affinités tinctoriales du collagène et qui n'est probablement pas autre chose que son précurseur (Gersh, Catchpole [16]).

Remarquons à ce propos que, d'après Pirani [24], l'accroissement de l'ampleur de la zone d'inflammation sous l'influence de la DOC *in vivo* serait dû, en grande partie, à un retard dans la maturation des fibroblastes et à l'augmentation de production de la substance fondamentale. Rappelons, enfin, que des images d'atteinte cellulaire, de dégénérescence et de tuméfaction ne sont pas rares dans les lésions attribuées à l'excès de DOC [14, 27].

En conclusion, on doit considérer l'effet d'un excès de DOC, tel que nous l'observons chez l'animal, comme la résultante finale d'actions et d'interactions qui s'accomplissent, au moins en partie, à un niveau plus élevé que la cellule par des mécanismes nerveux ou autres [6, 21], qui ne sont pas reproductibles, dans leur ensemble, *in vitro*. Certains éléments, pourtant, de cette action, éléments apparemment valables, peuvent apparaître dans

un système simplifié qui comporte essentiellement les cellules et l'hormone (1).

Résumé.

1° La cortisone, à des concentrations de l'ordre de 0,05 à 0,1 mg par centimètre cube, n'entrave point la croissance de fibroblastes de différentes origines, non plus que la croissance de l'épithélium rénal, au cours de cultures qui s'étendent sur deux à trois semaines.

2° La cortisone, à ces concentrations, freine parfois la migration initiale, à partir des fragments explantés, des cellules mobiles, mais elle n'empêche pas la mobilisation des cellules fixes, notamment celles de l'épithélium rénal, et leur transformation en cellules du type histiocyttaire.

3° La cortisone n'influence visiblement pas, *in vitro*, le processus de formation du collagène.

4° Des concentrations de cortisone de l'ordre de 0,5 mg par centimètre cube et plus, exercent une action prononcée sur la migration cellulaire, mais ne font apparaître des signes de souffrance évidents que dans des cultures de plusieurs semaines.

5° Le sérum des animaux traités par la cortisone assure la croissance tissulaire au moins aussi bien que le sérum normal. Les tissus provenant de ces animaux se comportent en culture comme les tissus normaux.

6° La désoxycorticostérone-base, ainsi que son acétate, affectent la croissance des fibroblastes d'origine splénique et, dans la même mesure, la croissance de l'épithélium rénal. Cette action n'est pas franchement toxique et léthale et on récupère des cultures viables après action de la désoxycorticostérone à la concentration de 0,5 mg par centimètre cube pendant six jours.

7° L'effet de la désoxycorticostérone est moins prononcé dans les cultures du tissu sous-cutané où on parvient à obtenir des cultures prolongées en présence de doses importantes de cette hormone. Dans ces cultures on observe en abondance des cellules

(1) C'est immédiatement après l'achèvement de la rédaction de la présente publication que nous avons pris connaissance du travail de Meier, Gross, Desaulles et Schär, ainsi que de celui de L. L. Layton, sur l'action des stéroïdes *in vitro* et *in vivo* (*Bull. Acad. Suisse Sci. Méd.*, 1952, 8, 34 et 74). Les observations de ces auteurs s'accordent généralement bien avec nos résultats en ce qui concerne l'action de la cortisone et de la DOC sur la migration et la croissance *in vitro* des éléments du tissu conjonctif.

D'autre part, la différence qu'établissent Meier et coll. entre les effets de l'action locale et générale de la DOC *in vivo* vient à l'appui de notre avis que la contradiction entre les résultats obtenus avec la DOC *in vivo* et *in vitro* est plus apparente que réelle.

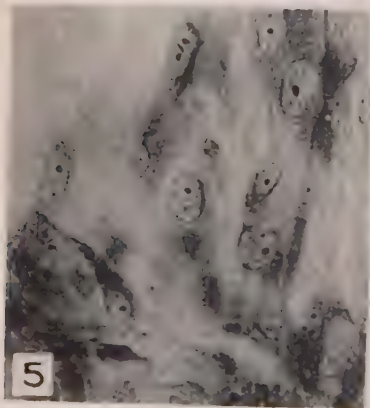
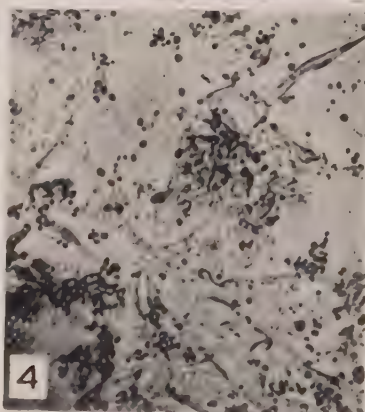
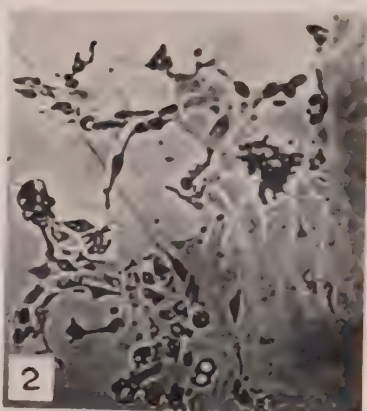
hypertrophiées qui se chargent de granulations et d'inclusions, prenant intensément le bleu d'aniline, le colorant du collagène.

8° On n'observe pas, en culture de tissus, d'antagonisme d'action entre la désoxycorticostérone et la cortisone.

9° Nous concluons que, si certains éléments de l'action tissulaire de ces deux hormones et de la désoxycorticostérone en particulier sont reproductibles *in vitro*, l'essentiel de leur action sur le système du tissu conjonctif se passe à un niveau plus élevé que celui de la cellule isolée.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] B. L. BAKER et C. W. CASTOR. *Anat. Rec.*, 1950, **106**, 173.
- [2] M. BARBER et A. DELAUNAY. Ces *Annales*, 1951, **81**, 193.
- [3] G. BARSKI, J. MAURIN, G. WIELGOSZ et P. LÉPINE. Ces *Annales*, 1951, **81**, 9.
- [4] A. BUSSARD, P. CORVAZIER, P. GRABAR et A. ASCHKENAZY. *Rev. Hémat.*, 1950, **5**, 130.
- [5] A. CARREL et A. H. EBELING. *J. exp. Med.*, 1926, **44**, 261.
- [6] C. CHAMPY et C. et R. COUJARD. *Ann. Endocrin.*, 1944, **5**, 165.
- [7] M. CHÈVREMONT. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **132**, 487.
- [8] I. CORNMAN. *Science*, 1951, **113**, 37.
- [9] F. COSTE, G. BASSET et A. DELAUNAY. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 89.
- [10] T. F. DOUGHERTY, J. H. CHASE et A. WHITE. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1945, **58**, 135.
- [11] F. DOUGHERTY et G. L. SCHNEEBELI. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **75**, 854.
- [12] A. DUPRÉ. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 1565.
- [13] B. EPHRUSSI et Y. HUGHES. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **105**, 697.
- [14] T. FAHR. *Virch. Arch.*, 1921, **232**, 134.
- [15] E. FAURÉ-FRÉMIET et H. GARBAULT. *C. R. Ass. Anat.*, 1932, 27^e Réun., 254.
- [16] G. GERSH et H. R. CATCHPOLE. *Am. J. Anat.*, 1949, **85**, 457.
- [17] D. H. HEILMAN. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1945, **20**, 310.
- [18] D. H. HEILMAN. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1945, **20**, 318.
- [19] M. HOLDEN, B. C. SEEGAL et J. RYBY. *Am. J. Path.*, 1951, **27**, 748.
- [20] I. S. JONES et K. MEYER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **74**, 102.
- [21] A. LIGHTWITZ. *Acquis. Med. Rec.*, 1950, 157.
- [22] H. J. MORTON, J. F. MORGAN et R. C. PARKER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **74**, 22.
- [23] R. C. PARKER. *J. exp. Med.*, 1936, **64**, 121.
- [24] C. L. PIRANI, R. C. STEPPA et K. SUTHERLAND. *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 217.
- [25] C. RAGAN, E. L. HOWES, C. M. PLOTZ, K. MEYER, J. W. BLUNT et R. LATTER. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 251.
- [26] J. A. RUSSELL. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 1950, **26**, 240.
- [27] H. SELYE, O. SYLVESTER, C. E. HALL et C. P. LEBLOND. *J. A. M. A.*, 1944, **124**, 201.



- [28] H. SELYE. *J. Clin. Endocrinol.*, 1946, **6**, 117.
 [29] R. SHAPIRO, B. TAYLOR et M. TAUBENHAUS. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1951, **76**, 854.
 [30] M. TAUBENHAUS et G. D. AMROMIN. *Endocrinol.*, 1949, **44**, 359.
 [31] M. TAUBENHAUS et G. D. AMROMIN. *J. Lab. Clin. Med.*, 1950, **36**, 7.
 [32] J. A. THOMAS. *Arch. Exp. Zellforsch.*, 1934, **15**, 131.

PLANCHE

Les figures 1, 2, 3 et 4 présentent des cultures vivantes photographiées au gross. $\times 180$ avec filtre jaune-orangé.

Les figures 5 et 6 présentent des cultures fixées et colorées *in toto* à l'azan d'après Mallory-Heidenhain, photographiées au gross. $\times 465$ avec filtre rouge Wratten 25 A.

FIG. 1. — Culture de rate de lapin en présence de $0,5 \text{ mg/cm}^3$ de cortisone. Dix-neuvième jour de culture.

FIG. 2. — Culture de rein de lapin en présence de $0,05 \text{ mg/cm}^3$ de cortisone. Sixième jour de culture. Lamé épithéliale et cellules de type histiocytaire qui s'en libèrent.

FIG. 3. — Culture de rate de lapin en présence de $0,5 \text{ mg/cm}^3$ de désoxycorticostérone. Sixième jour de culture. Absence de cellules viables dans la zone de migration.

FIG. 4. — Même culture que figure 3. Neuvième jour de culture, trois jours après élimination de la désoxycorticostérone. Migration importante des fibroblastes.

FIG. 5. — Culture de tissu sous-cutané de lapin dans un milieu témoin. Dix-huitième jour de culture. Fibroblastes typiques avec quelques faisceaux de collagène extracellulaire.

FIG. 6. — Culture de tissu sous-cutané de lapin en présence de $0,1 \text{ mg/cm}^3$ de désoxycorticostérone. Dix-huitième jour de culture. Fibroblastes hypertrophiés avec multiples granulations et inclusions colorées au bleu d'aniline.

INFLUENCE DU RÉGIME CARBONE SUR LE DÉVELOPPEMENT DES BACTÉRIOPHAGES CHEZ UN *PSEUDOMONAS PYOCYANEA* (*)

par F. JACOB.

(Service de Physiologie microbienne, Institut Pasteur.)

INTRODUCTION.

Le degré d'interférence d'un bactériophage sur le métabolisme de la bactérie-hôte varie suivant le système bactérie-bactériophage considéré. Pour une même souche bactérienne, on peut schématiquement distinguer deux types de bactériophages. Les uns, que nous appellerons *virulents*, bloquent, dès leur pénétration, la croissance de la bactérie-hôte, la synthèse de ses enzymes respiratoires [1], de l'acide ribonucléique [2], des enzymes adaptatifs [3]. Les autres, que nous appellerons *tempérés*, permettent à la bactérie une certaine croissance résiduelle avant la lyse [4], la synthèse d'enzymes respiratoires, de l'acide ribonucléique [5], et des enzymes adaptatifs [6]. Contrairement aux phages virulents, les phages tempérés proviennent généralement des cultures de bactéries lysogènes. Les deux systèmes diffèrent donc par de nombreux caractères (1).

Nous nous sommes proposé d'analyser l'utilisation de l'aliment carboné consommé par les bactéries pendant la multiplication des deux types de phages. Les systèmes employés étaient formés par une souche de *Pseudomonas pyocyanea*, et par deux bactériophages, dont l'un se comporte comme un phage « virulent » à l'égard de cette souche, et l'autre comme un phage « tempéré ». En faisant varier le taux de glucose utilisable par les bactéries, on a étudié indirectement, par la mesure de la croissance ou par celle de la respiration, le métabolisme bactérien au cours de la multiplication des deux phages. En particulier, on a recherché, dans le cas du phage virulent, si la totalité, ou une fraction seulement, de l'aliment carboné consommé par les bactéries était utilisée pour les synthèses de phages ; et, dans le cas du phage tempéré, si la mul-

(*) Travail effectué avec l'aide d'une subvention du *National cancer Institute of the National Institutes of Health* des Etats-Unis d'Amérique.

(1) La distinction entre phages virulents et tempérés est toute relative et ne vaut que pour une bactérie donnée.

tiplication du phage pouvait être dissociée de la croissance bactérienne.

PRINCIPE DES EXPÉRIENCES. — Pour faire varier le taux d'aliment carboné utilisable par les bactéries pendant la multiplication des bactériophages, on a employé l'ensemble formé par le lactose et la β -galactosidase. On sait que cet enzyme hydrolyse le lactose suivant la réaction :



Les souches de *P. pyocyanea* employées pour ces expériences ne peuvent utiliser ni le lactose, ni le galactose comme source de carbone. En présence du système lactose + β -galactosidase, elles utilisent seulement le glucose libéré par la réaction enzymatique. Ces systèmes enzyme-substrat sont stables pendant la durée des expériences et permettent d'obtenir des régimes d'alimentation définis par le nombre de molécules de glucose libérées par heure et par millilitre. Ces régimes sont réglables, car ils sont sensiblement proportionnels à la concentration de l'enzyme lorsque le lactose est en excès. Les expériences ont donc consisté à infecter ou à irradier des suspensions bactériennes préalablement carencées en aliment carboné. En présence d'un excès de lactose, on a alors ajouté des quantités variables de β -galactosidase. Puis on a mesuré la densité optique, le métabolisme respiratoire et le rendement en phages des cultures.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1° *Souches bactériennes.* — La souche lysogène de *P. pyocyanea* 13(8)A, qui perpétue le bactériophage « tempéré » p 8, et la souche indicatrice 13 ont été décrites dans un mémoire précédent [7].

2° *Bactériophages.* — Le bactériophage « tempéré » p 8 a été précédemment décrit [7]. Le bactériophage « virulent » P 2 est actif sur les souches 13 et 13(8)A. Les caractéristiques des deux bactériophages sont comparées sur le tableau I. Leurs courbes de survie, après irradiations par un rayonnement ultra-violet, sont représentées sur la figure 1. Ils sont sérologiquement distincts.

3° *Milieu.* — Nous avons utilisé le milieu suivant : KH_2PO_4 , 13,6 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,01 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0005 g ; eau, 1 000 g ; KOH. q.s.p. pH, 7,0. Le glucose et le lactose sont stérilisés à part et ajoutés séparément au moment de l'emploi. Le milieu gélosé utilisé pour les numérations de bactériophages contient : néopeptone Difco 10 g ; glucose 1 g ; NaCl 5 g ; gélose 10 g ; eau 1 000 g. La couche supérieure contient 7 g de gélose pour 1 000.

TABLEAU I. — Caractères comparés des bactériophages p8 et P2.

	p8	P2
Taille(°) diamètre de la tête	770 Å	650 Å
longueur de la queue	2000 Å	1000 Å
Adsorption en 10 min. à 37° sur 10 ⁸ bact/ml, en milieu synthétique	souche 13 . 60 % souche 13(8)A -	45 % 45 %
Période latente minima en milieu synthétique	Infection de la souche sensible 13 55-65 mn Irradiation de la souche lysogène 13 (8) A 80-100 mn	25-30 mn -
Taille des plages	petites	grandes
Densité optique des cultures au cours de phase latente	augmente	stationnaire
Rendement unitaire par centre infectieux en milieu synthétique.	Infection de la souche sensible 13 40 à 60 Irradiation de la souche lysogène 13 (8) A 70-90	50 à 70 -
Nombre de bactéries résistantes dans une culture exponentielle de la souche 13 en milieu synthétique	10 ⁻³	2.10 ⁻⁷
Nature de ces bactéries résistantes . .	nombreux lysogènes	pas de lysogènes
Inactivation par les rayons U.V. (°°)	peu sensibles	très sensibles

(°) Déterminations faites au microscope électronique dans le laboratoire de physique de l'Université de Genève par G. et E. Kellenberger.

(°°) Voir figure 1.

4° La β -galactosidase (lactase) a été préparée par M. Cohn et J. Monod à partir d'une culture d'*Escherichia coli*. On trouvera dans leur mémoire [8] les principales caractéristiques physico-chimiques de l'enzyme. L'échantillon utilisé dans nos expériences a été titré pour son activité lactasique par la méthode manométrique, en présence de notatine et de catalase. Il libérait 590 micromoles de glucose heure⁻¹ ml⁻¹, à 37°, dans le milieu décrit plus haut (saturation en potassium). On appellera « dilutions de la lactase » les dilutions finales obtenues à partir de l'extrait brut d'*E. coli*.

Le lactose était toujours ajouté en excès (5 p. 1 000). Avec les dilutions d'enzyme employées, la quantité de lactose hydrolysé à la fin des expériences était toujours inférieure à 10 p. 100 de la quantité initiale.

5° Préparation des cultures arrêtées standard. — Il était nécessaire d'obtenir des suspensions bactériennes dépourvues d'aliment

carboné utilisable par les bactéries. Pour cela, une fiole de milieu contenant 1 g de glucose pour 1 000 étaitensemencée avec 10^7 bactéries par millilitre et agitée à 37° pendant quatre ou cinq heures. Dans ces conditions, la croissance est limitée uniquement par l'épuisement du glucose (cf. [9]). Après l'arrêt de la croissance, suivie par la mesure de la densité optique, la culture était centrifugée pendant cinq minutes à 4 000 tours/minute, pour éliminer les bacté-

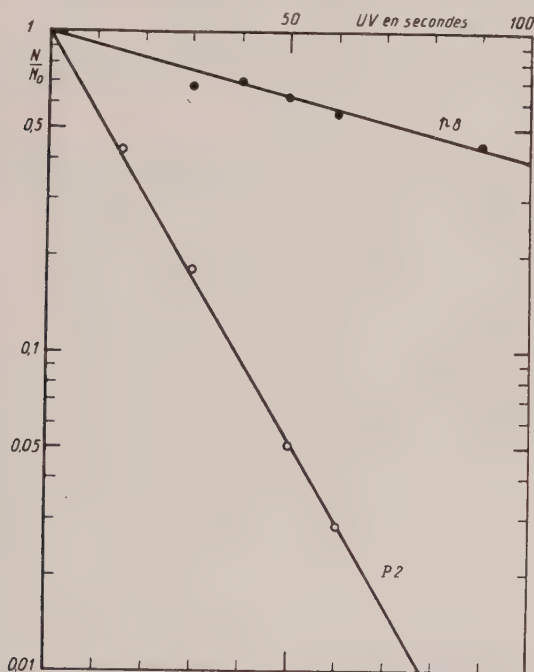


Fig. 1. — Survie des bactériophages p8 et P2 sous l'action des rayons ultra-violets. En abscisse, la dose d'U. V. en secondes. En ordonnée, sur une échelle logarithmique, la fraction survivante.

riophages libres. Le culot bactérien était remis en suspension dans le milieu sans glucose de manière à obtenir une densité optique d'environ 50. Cette suspension était agitée une heure à 37° pour épuiser la majeure partie des réserves bactériennes. La croissance d'une telle « suspension arrêtée standard » reprend au taux normal dès que l'on ajoute du glucose ou quelques minutes plus tard.

6° Infection et irradiation des suspensions. — Pour infecter les bactéries, on ajoutait des bactériophages aux suspensions carencées standard, à raison de 10 phages par bactérie. Le mélange était

agité pendant dix minutes à 37°. Les suspensions étaient alors centrifugées pendant cinq minutes à 4 000 tours/minute, et le culot remis en suspension dans un même volume de milieu sans glucose. La « multiplicité » réelle de l'infection était alors de 4 à 5 pour le phage P2 sur les souches 13(8)A et 13, et de 5 à 7 pour le phage p8 sur la souche 13.

L'induction de la souche lysogène 13(8)A sous l'effet d'un rayonnement U.V. a été décrite dans un mémoire précédent [7]. La dose utilisée correspondait à 375 ergs mm⁻² pour la longueur d'onde 2 537 Å. Dans ces conditions 90 à 95 p. 100 des bactéries étaient induites. Toutes les manipulations étaient ensuite effectuées dans l'obscurité.

7° *Cultures et mesures de croissance.* — Les suspensions irradiées ou infectées, ou témoins, recevaient un excès de lactose (5 p. 1 000) puis étaient distribuées dans des tubes à section carrée et à faces parallèles à raison de 2,9 ml par tube. On ajoutait alors 0,1 ml d'une dilution choisie de lactase, ou de glucose à 30 p. 100, ou de tampon. Les tubes étaient ensuite agités à 37°. Le temps était compté à partir du moment où l'on ajoutait la lactase. La croissance bactérienne était évaluée par la mesure de la densité optique des suspensions dans l'électrophotomètre de Meunier. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires. Pour les cultures en voie de croissance, l'unité de densité optique en lumière bleue correspond approximativement à 10⁶ bactéries/ml de la taille observée pendant la phase exponentielle. Avant chaque expérience, le nombre de bactéries viables était mesuré par étalement sur gélose.

8° *Mesures de l'intensité respiratoire.* — La consommation d'oxygène était mesurée dans l'appareil de Warburg, en présence de KOH à 28° ou 37°. Les suspensions irradiées ou infectées contenant du lactose étaient distribuées dans les fioles à raison de 3 ml par fiole. Dans le diverticule latéral, on plaçait 0,15 ml de lactase, ou de solution de glucose à 30 p. 100, ou de tampon. Après dix minutes de mise en équilibre, les robinets étaient fermés et le contenu des diverticules renversé dans le compartiment central. Chaque essai était effectué en double exemplaire.

9° *Rendement en bactériophages.* — Les numérations de bactériophages n'ont pu être réalisées selon les techniques habituelles de l'expérience à « cycle unique ». En effet, le régime est établi pour un nombre donné de bactéries. On ne peut diluer les suspensions au delà d'une certaine valeur sans modifier l'activité de l'enzyme. Les prélèvements étaient donc effectués directement sur la culture, puis dilués de façon convenable et étalés sur gélose avec la souche indicatrice.

On ne peut utiliser de sérum antibactériophage. L'addition de sérum à des bactéries très protéolytiques risquerait en effet d'ap-

porter un aliment carboné à des milieux où la concentration en aliment carboné est précisément le facteur étudié.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

I. EFFETS DU RÉGIME CARBONÉ SUR LA CROISSANCE BACTÉRIENNE. — Pour étudier la croissance de cultures soumises à différents régi-

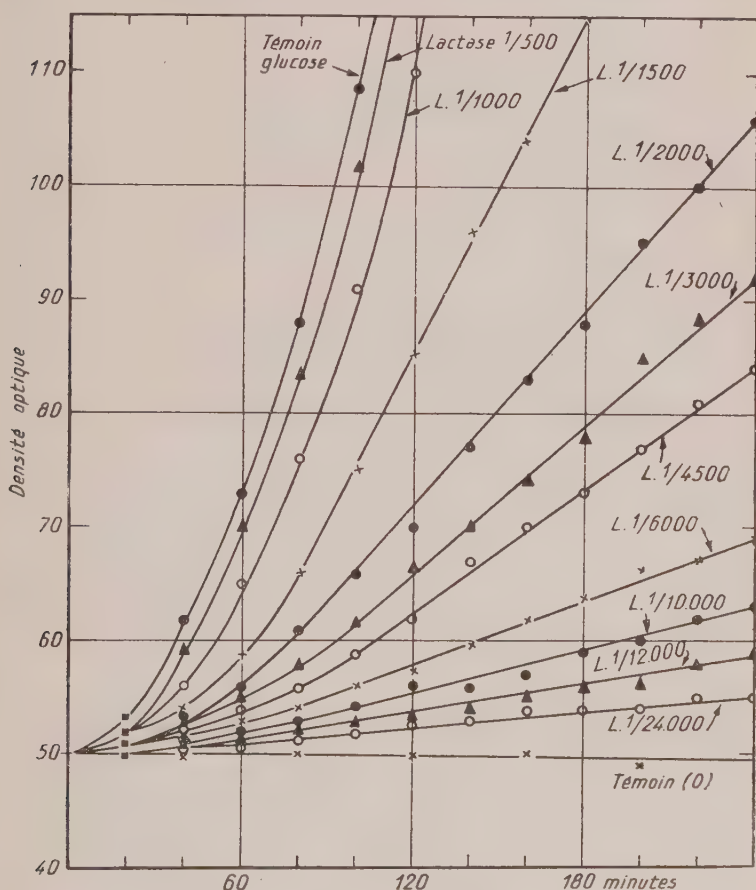


FIG. 2. — Influence du régime carboné sur la croissance de la souche 13 (8) A. Les fractions d'une culture arrêtée standard reçoivent des quantités variables de lactase, puis sont agitées à 37°. En abscisse, le temps en minutes. En ordonnée, la densité optique.

mes glucosés, on a ajouté des quantités variables de lactase à des fractions d'une suspension arrêtée standard de 13(8)A contenant 5 p. 1 000 de lactose et on a suivi la densité optique des cultures

agitées à 37°. Les résultats d'une telle expérience sont rapportés sur la figure 2 qui représente la densité optique en fonction du temps. On voit que :

a) la densité optique du témoin sans lactase est stable. Ceci prouve que la suspension arrêtée standard est effectivement privée d'aliment carboné utilisable pour la croissance ;

b) la densité optique du témoin glucosé augmente exponentiellement ;

c) pour les dilutions de lactase inférieures à 1 p. 1 000, la croissance bactérienne reste exponentielle dans les limites de l'expérience, c'est-à-dire entre 5.10^7 et 2.10^8 bactéries par millilitre. Dans ces conditions, le régime de glucose assure donc la croissance à taux maximum ;

d) pour chaque dilution de lactase comprise entre 1 p. 1 000 et 1 p. 4 500, la croissance, d'abord exponentielle, devient linéaire et ceci d'autant plus tôt que la dilution de la lactase est plus grande ;

e) pour les dilutions de lactase supérieures à 1 p. 4 500, la densité optique augmente d'emblée de façon linéaire. Aux erreurs de mesures près, les pentes des courbes obtenues sont sensiblement proportionnelles aux concentrations de la lactase.

Cette expérience montre que, lorsque l'enzyme est suffisamment dilué, le régime carboné limite la croissance bactérienne. Les bactéries consomment tout le glucose qui leur est fourni. Comme le régime est constant, l'augmentation de substance bactérienne par unité de temps est également constante. On peut donc aisément régler la croissance bactérienne par la dilution de l'enzyme. Toutefois, lorsque les dilutions de l'enzyme deviennent trop grandes (supérieures à 1 p. 50 000), la croissance bactérienne est supprimée ou procède par à-coups.

II. INFLUENCE DU RÉGIME CARBONÉ SUR LE DÉVELOPPEMENT DU BACTÉRIOPHAGE « VIRULENT ». — Puisque les bactéries utilisent le glucose qui est libéré à vitesse réduite par le système lactose + β -galactosidase, il est possible d'étudier le développement des bactériophages chez des bactéries soumises à des régimes faibles.

On sait qu'en l'absence d'aliment carboné utilisable, *E. coli* B est incapable d'assurer la reproduction des bactériophages ϕ II [3] ou T₂ [4]. Lorsqu'on ajoute du glucose, le développement du phage commence. Il n'y a pas de croissance bactérienne au cours de la phase latente. Le taux de la consommation d'oxygène par la culture reste égal à ce qu'il était immédiatement avant l'infection. Ceci montre que les enzymes présents continuent à oxyder l'aliment carboné à la vitesse maxima. Un système analogue, formé par la souche 13(8)A et le phage P2, a été étudié en présence de régimes glucosés variables.

Etude de la lyse. — Une suspension de bactéries 13(8)A, infectée par des bactériophages « virulents » P2 et contenant 5 p. 1 000 de lactose, est divisée en plusieurs fractions. Des quantités variables de lactase sont ajoutées à ces fractions. Dans l'une des suspensions témoins, on n'ajoute pas d'enzymes, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'aliment carboné utilisable. L'autre reçoit un excès de glu-

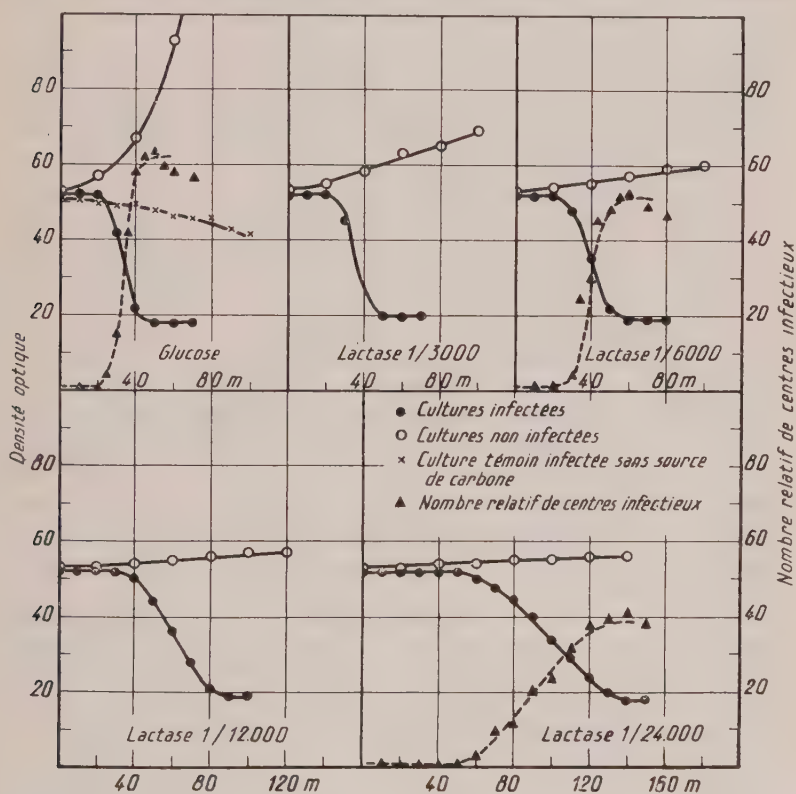


FIG. 3 — Influence du régime carboné sur une culture de 13(8)A infectée par le bactériophage P2. Les fractions d'une culture arrêtée standard de 13(8)A infectées ou non infectées, reçoivent des quantités variables de lactase, puis sont agitées à 37°. En abscisse, le temps en minutes. En ordonnée, la densité optique et le nombre relatif des centres infectieux.

cose (10 p. 1 000). Les suspensions sont alors agitées à 37°. La figure 3, où sont indiqués les résultats de cette expérience, représente, en fonction du temps, les variations de la densité optique et du nombre relatif des centres infectieux. On voit que :

a) la densité optique du témoin privé de source de carbone décroît progressivement. Il n'y a pas de libération de bactériophages ;

b) la densité optique du témoin glucosé reste stable pendant la période latente. La lyse survient vers la vingt-cinquième minute ;

c) lorsque la lactase est diluée à 1/3 000, la durée de la période latente et celle de la lyse ne sont pas modifiées. A 1 p. 6 000, elles sont seulement un peu augmentées (moins de cinq minutes pour la durée de la période latente). Le rendement moyen en phages est légèrement diminué : 51 au lieu de 62, pour le témoin glucosé ;

d) lorsque la lactase est diluée à 1/12 000 et à 1/24 000, la durée de la période latente et celle de la lyse sont fortement augmentées. Pendant la même période, les témoins non infectés présentent une croissance mesurable. Le rendement en phages est encore abaissé : 38 avec la dilution 1 pour 24 000.

Comme on l'a déjà signalé, les rendements en bactériophages ne sont pas déterminés selon la technique de l'expérience « à cycle unique », car l'enzyme ne peut être dilué au delà d'une certaine limite. Avec la concentration bactérienne existant dans les tubes de croissance (5.10^7 /ml), les bactériophages libérés par la lyse peuvent en partie être réadsorbés sur les bactéries encore non lysées ou sur les débris bactériens et, par conséquent, être perdus comme centres infectieux. Cet effet est particulièrement marqué lorsque la lyse est ralentie. La diminution réelle du rendement doit donc être inférieure aux chiffres donnés qui n'ont qu'une valeur relative.

Cette expérience montre que la diminution progressive du taux de glucose utilisable par les bactéries permet de distinguer deux stades différents :

certains régimes, qui ne modifient pas la durée de la période latente, limitent la croissance des bactéries témoins non infectées et diminuent légèrement le rendement moyen en phages des bactéries infectées ;

les régimes plus faibles, au contraire, augmentent la durée de la période latente.

On voit, sur la figure 3, que la diminution du régime augmente plus fortement la durée de la lyse que celle de la période latente. Ceci semble traduire un étirement de la distribution des périodes latentes individuelles. Pour comparer les durées d'évolution des bactériophages chez des bactéries soumises à des régimes variables, il a paru préférable de choisir, plutôt que la fin de la période latente, le moment où 50 p. 100 des bactéries ont produit des phages et se sont lysées. On appellera donc « période de lyse moyenne » (P.L.M.) le temps écoulé entre le moment où la lactase est ajoutée à la suspension bactérienne, et celui qui correspond à une diminution de la densité optique égale à la moitié de la diminution totale. On voit, sur la figure 3, qu'avec les régimes limitant le développement du phage, si la dilution de la lactase est doublée, la P.L.M.

n'est multipliée que par un facteur 1,5 à 1,7. Ce résultat sera discuté plus loin.

Etude de la respiration. — Puisqu'on peut réduire le régime de manière à limiter la croissance bactérienne sans modifier la période

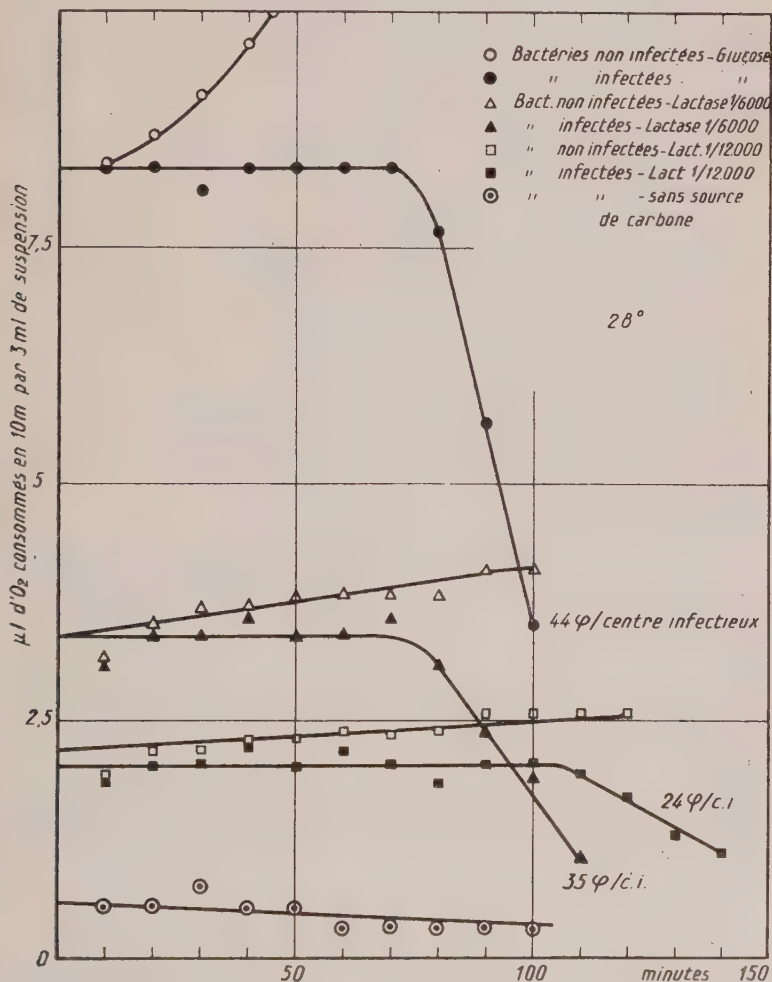


FIG. 4 — Influence du régime carboné sur l'intensité respiratoire des cultures de 13 (8) *A* infectées par le bactériophage P2 ou non infectées. Les suspensions sont distribuées dans les fioles de l'appareil de Warburg. Après dix minutes de mise en équilibre, on verse la lactase qui était répartie dans les diverticules latéraux à des concentrations variables. En abscisse, le temps en minutes. En ordonnée, les μl d' O_2 consommés en dix minutes par 3 ml de suspension. Les rendements en bactériophages sont obtenus en rapportant le nombre des centres infectieux mesurés à la fin de l'expérience au nombre des centres infectieux observés pendant la période latente.

latente pendant la multiplication du phage P2, nous avons recherché comment varie la respiration des bactéries infectées quand on modifie le régime. La consommation d'oxygène a été mesurée dans l'appareil de Warburg à 28°. La figure 4, qui indique les résultats de cette expérience, représente en fonction du temps la quantité d'oxygène consommée en dix minutes par 3 ml de suspension. On voit que l'intensité respiratoire de la suspension infectée contenant un excès de glucose reste stable pendant près de soixante-dix minutes, puis diminue brusquement au moment de la lyse. Au début de l'expérience l'intensité respiratoire de la suspension infectée est égale à celle du témoin non infecté contenant du glucose.

Quand la lactase est diluée à 1/6 000, l'intensité respiratoire de la suspension infectée est fortement diminuée : presque trois fois moindre qu'en présence d'un excès de glucose. La durée de la période latente n'est pas modifiée. Le rendement en phages est de 35 contre 44 chez le témoin glucosé. Avec la même dilution d'enzyme, l'intensité respiratoire du témoin non infecté augmente lentement mais régulièrement.

Quand la lactase est diluée à 1/12 000, l'intensité respiratoire de la suspension infectée n'est plus que le sixième environ de celle que présente le témoin glucosé. La période latente est allongée, cent à cent dix minutes au lieu de soixante-dix. Le rendement en phages est abaissé à 24.

Cette expérience montre que l'on peut réduire fortement la consommation d'aliment carboné par les bactéries infectées, sans retarder le développement du bactériophage. Lorsque les bactéries disposent d'un excès de glucose, celui-ci est oxydé à la même vitesse après l'infection qu'immédiatement avant. Ce résultat est comparable aux observations faites sur *E. coli* B infecté par ϕ II [3] ou T₂ [4]. Mais avec la souche de *P. pyocyanea* 13(8)A infectée par le phage « virulent » P2, une faible partie seulement de ce glucose est utilisée dans les réactions qui conduisent à la synthèse des phages, puisqu'on peut réduire environ trois fois le métabolisme respiratoire sans autre effet qu'une légère diminution du rendement. C'est seulement au-dessous de ce régime que la synthèse des bactériophages est ralentie.

III. INFLUENCE DU RÉGIME CARBONÉ SUR LE DÉVELOPPEMENT DU BACTÉRIOPHAGE « TEMPÉRÉ ». — De même que le phage « virulent », le phage « tempéré » ne se développe pas en l'absence d'aliment carboné. La souche 13(8)A, soumise à une carence glucidique après irradiation par un rayonnement U.V., ne se lyse pas. Lorsqu'on ajoute un excès de glucose, même après six heures de carence, la densité optique des cultures irradiées s'élève, puis la lyse survient [7]. La croissance résiduelle observée avant la lyse n'est jamais accompagnée d'une augmentation des centres infectieux.

En soumettant les bactéries à des régimes de glucose variables, on a cherché à dissocier le développement du phage de la croissance bactérienne.

Etude de la lyse. — Une suspension de bactéries 13(8)A contenant 5 p. 1 000 de lactose est irradiée et distribuée en tubes. Des quantités variables de lactase sont ajoutées à ces suspensions. Un témoin ne reçoit pas d'enzyme, donc reste sans source de carbone utilisable. Un autre reçoit un excès de glucose. Les suspensions

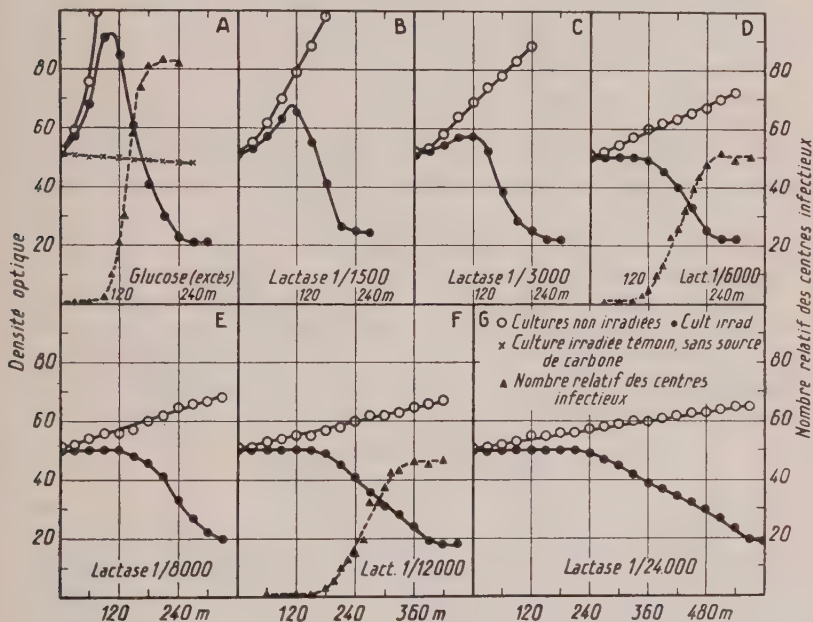


FIG. 5. — Influence du régime carboné sur une culture de bactéries lysogènes 13 (8) A, irradiées. Les fractions d'une culture arrêtée standard de 13 (8) A irradiées ou non irradiées, reçoivent des quantités variables de lactase, puis sont agitées à 37°. En abscisse, le temps en minutes. En ordonnée, la densité optique et le nombre relatif des centres infectieux.

sont alors agitées à 37°. Sur la figure 5, qui rapporte les résultats d'une telle expérience, sont représentées, en fonction du temps, les variations de la densité optique et du nombre relatif des centres infectieux. L'examen de la figure 5 montre que :

- la densité optique du témoin irradié privé d'aliment carboné diminue très lentement. Il n'y a pas libération de bactériophages ;
- le témoin irradié disposant d'un excès de glucose présente, au cours des quatre-vingt-dix minutes de la phase latente, une croissance résiduelle correspondant à un doublement de la densité opti-

que. Après quatre-vingt-dix minutes, les bactéries se lysent en libérant des bactériophages ;

e) quand la lactase est diluée à 1 p. 1 500 et 1 p. 3 000, la densité optique des cultures irradiées augmente pendant la phase latente. Plus grande est la dilution de la lactase, plus faible la croissance résiduelle ;

d) avec la dilution de lactase à 1 p. 6 000, la densité optique de la suspension irradiée reste constante pendant les cent dix premières minutes, alors que le témoin non irradié présente une croissance mesurable. Après cent dix minutes, les bactéries se lysent et produisent des bactériophages ;

e) si l'on augmente la dilution de la lactase (1 p. 12 000 et 1 p. 24 000), il y a encore lyse avec libération de bactériophages, mais la durée de la période latente et celle de la lyse augmentent progressivement. Toutefois, comme dans le cas du bactériophage virulent, la P.L.M. n'est pas proportionnelle à la dilution de l'enzyme. Lorsqu'on double la dilution de la lactase, la P. L. M. est multipliée seulement par un facteur 1,5 à 1,7 ;

f) le rendement moyen en bactériophages diminue avec l'importance de la croissance résiduelle et se maintient à peu près stable lorsque celle-ci est supprimée, même quand les régimes deviennent très faibles. Sur le tableau II, qui représente les résultats de plusieurs expériences, on voit que le rapport

$$\frac{\text{rendement en bactériophage}}{\text{densité optique maxima}}$$

ne varie pas de plus de 20 p. 100 au cours d'une expérience. Nous avons annoncé dans une note préliminaire [40], que le rendement en bactériophages n'était pas diminué lorsque la croissance résiduelle était supprimée. Ce résultat devait être dû à l'emploi de sérum antibactériophage qui pouvait apporter une source d'aliment carboné, et fausser ainsi les conditions de l'expérience.

On voit donc que la diminution progressive du taux de glucose utilisable par les bactéries lysogènes irradiées n'affecte pas également la croissance résiduelle des bactéries et la multiplication du phage tempéré. Il y a deux stades bien distincts :

certaines régimes, qui ne modifient pas la période latente de façon importante, limitent la croissance des bactéries témoins non irradiées, diminuent ou même suppriment la croissance résiduelle des bactéries irradiées et abaissent le rendement moyen en phages ;

des régimes plus faibles, au contraire, augmentent la durée de la période latente.

Tout se passe donc comme si, au-dessous d'un certain régime, le glucose disponible était utilisé pour les seules synthèses du phage. Lorsque le régime est plus élevé, mais alors seulement, une cer-

TABLEAU II. — Variations du rendement en bactériophages p8 avec les changements de régime carboné.

Exp. n°	lactase	Rend. moyen (°)	DO maxima (°°)	Rend. ^t
				DO maxima
3	Témoin glucose	83	92	0,90
	lactase I/3.000	68	77	0,88
	" I/6.000	51	55	0,93
	" I/10.000	48	55	0,87
	" I/12.000	43	55	0,78
4	Témoin glucose	57	89	0,64
	lactase I/6.000	32	46	0,68
	" I/12.000	35	46	0,72
	" I/24.000	29	46	0,63
6	Témoin glucose	84	91	0,93
	Lactase I/6.000	50	50	1
	" I/12.000	46	50	0,92
7	Témoin glucose	77	96	0,80
	Lactase I/1.500	73	89	0,82
	" I/3.000	61	71	0,86
	" I/6.000	47	51	0,91
	" I/12.000	49	51	0,96
	" I/24.000	45	51	0,88

(*) Les rendements moyens sont calculés en rapportant le nombre total de bactériophages libres mesurés à la fin de l'expérience au nombre de centres infectieux observés au cours de la période latente.

(**) La densité optique est exprimée en divisions de l'électrophotomètre.

taine quantité de glucose reste disponible pour les synthèses bactériennes.

L'expérience précédente a été réalisée avec une culture irradiée de la souche lysogène 13(8)A. On peut obtenir un résultat analogue en infectant une culture de la souche indicatrice avec des bactériophages « tempérés » p8. A titre d'exemple, on a reproduit, sur la figure 6, les résultats d'une expérience pendant laquelle une culture de la souche 13, infectée par le phage p8, a été soumise à des régimes glucosés variables. On voit que la croissance résiduelle des bactéries infectées diminue progressivement quand la dilution de la lactase augmente. Elle est supprimée avec la dilution 1 p. 6 000. Cette expérience montre une fois de plus l'analogie de comportement qui existe entre les bactéries sensibles infectées et les bactéries lysogènes irradiées.

Etude de la respiration. — Puisqu'on peut réduire fortement le régime glucosé et supprimer la croissance résiduelle des bactéries irradiées sans empêcher le développement du phage « tempéré » p8, l'intensité de la respiration a été mesurée chez des bactéries lysogènes irradiées puis soumises à un faible régime glucosé. La consommation d'oxygène a été mesurée dans l'appareil de Warburg à 37°. Les résultats de cette expérience sont donnés par la figure 7, qui représente, en fonction du temps, la quantité d'oxygène consommée en dix minutes par 3 ml de suspension. On voit qu'en présence d'un excès de glucose, l'intensité respiratoire de la

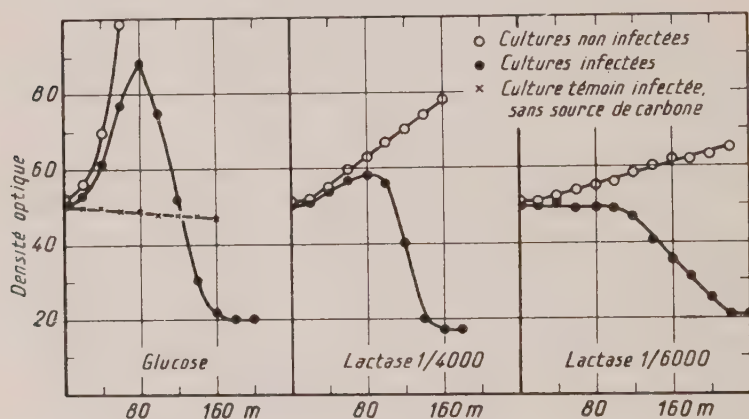


FIG. 6. — Influence du régime carboné sur une culture de bactéries sensibles 13 infectées par le bactériophage p8. Les fractions d'une culture arrêtée standard de 13, infectées ou non infectées, reçoivent des quantités variables de lactase, puis sont agitées à 37°. En abscisse, le temps en minutes. En ordonnée, la densité optique.

suspension irradiée augmente progressivement pendant les quatre-vingt-dix premières minutes. Elle a alors approximativement doublé. Puis elle diminue rapidement. L'intensité respiratoire de la suspension irradiée contenant de la lactase à 1 p. 6 000 est d'emblée beaucoup plus faible que celle de la suspension précédente. Elle reste sensiblement constante au cours des cent dix premières minutes puis commence à diminuer. Dans le cas du témoin non irradié contenant également de la lactase à 1 p. 6 000, l'intensité respiratoire augmente lentement mais de façon mesurable.

La quantité de glucose oxydé par les bactéries pendant la multiplication du phage tempéré p8 peut donc être fortement réduite. Dans ces conditions, la synthèse des enzymes respiratoires observée dans les cultures disposant d'un excès de glucose est supprimée.

L'intensité respiratoire des bactéries irradiées reste constante pendant la phase latente.

IV. SYNTHÈSES BACTÉRIENNES PENDANT LE DÉVELOPPEMENT DU BACTÉRIOPHAGE « TEMPÉRÉ » p8. — Pendant le développement du

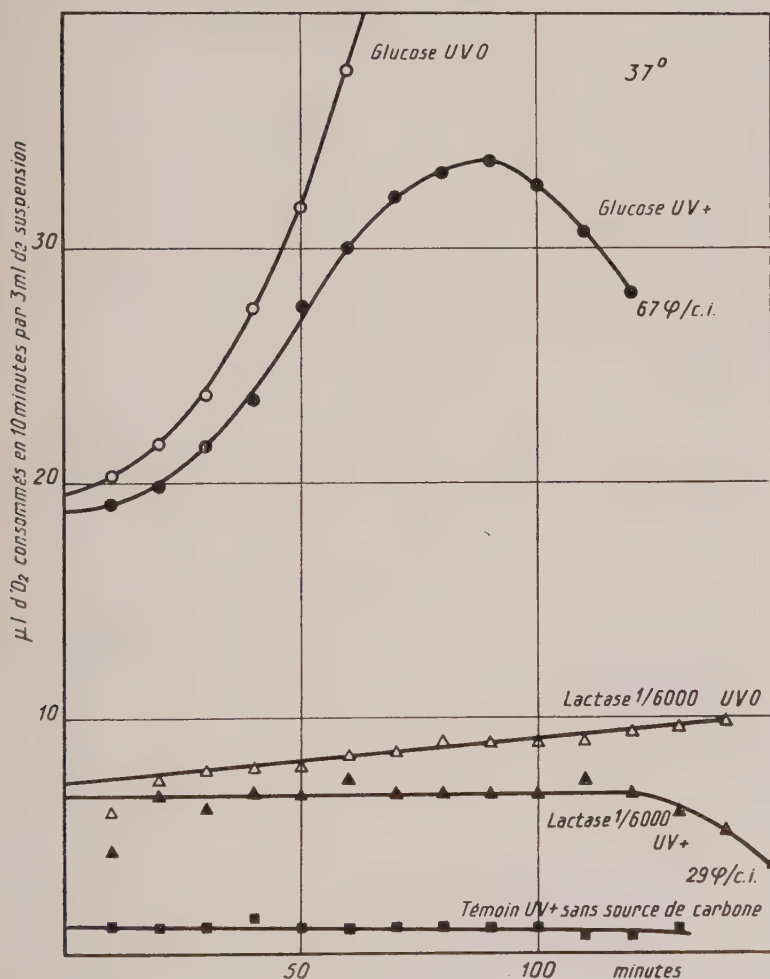


FIG. 7. — Influence du régime carboné sur l'intensité respiratoire des cultures irradiées ou non irradiées de 13 (8) A. Les suspensions sont distribuées dans les fioles de l'appareil de Warburg. Après dix minutes de mise en équilibre, on verse la lactase qui a été répartie dans les diverticules latéraux à des concentrations variables. En abscisse, le temps en minutes. En ordonnée, les μl d' O_2 consommés en dix minutes par 3 ml de suspension. Les rendements en bactériophages sont obtenus en rapportant le nombre des centres infectieux mesurés à la fin de l'expérience au nombre de bactéries induites.

phage tempéré, les synthèses bactériennes observées en présence d'un excès de glucose peuvent être supprimées par l'emploi de régimes suffisamment faibles. Une telle culture se prête à l'étude de la variation du pouvoir de synthèse chez les bactéries au cours de la reproduction du phage tempéré.

Une suspension de bactéries 13(8)A contenant du lactose est irradiée. On ajoute alors de la β -galactosidase de manière à obtenir une dilution finale de 1 p. 6 000. La culture est agitée à 37°. Toutes les dix minutes, un échantillon prélevé sur cette culture reçoit un excès de glucose (10 p. 1 000). On suit alors les variations de la densité optique sur chacun des échantillons. La figure 8, qui rapporte les résultats de cette expérience, représente pour chaque échantillon le logarithme à base 2 de la densité optique en fonction du temps. On voit que :

a) la culture alimentée en glucose par le systyème lactose + β -galactosidase à 1 p. 6 000 n'a pas présenté de croissance résiduelle. La lyse a débuté vers la cent dixième minute ;

b) l'addition de glucose à temps 0 permet presque un doublement de la densité optique. La lyse est survenue vers la quatre-vingt-dixième minute ;

c) lorsque le glucose est ajouté après vingt minutes, la pente initiale de la courbe de croissance est sensiblement la même que lorsque le glucose est ajouté à temps 0. La croissance totale est légèrement diminuée, la durée de la période latente un peu allongée ;

d) si le glucose est ajouté entre la trentième et la quatre-vingt-dixième minute, les bactéries présentent encore une croissance résiduelle, mais plus on tarde à ajouter le glucose, plus la pente initiale de la courbe diminue. La durée de la période latente augmente lentement et progressivement ;

e) après la quatre-vingt-dixième minute l'addition de glucose ne modifie pratiquement plus les événements : la durée de la période latente est la même que celle du témoin qui n'a pas reçu de glucose, il n'y a plus de croissance bactérienne.

On a également porté sur la figure 8 le rendement moyen en bactériophages calculé en divisant le nombre de centres infectieux obtenus à la fin de l'expérience par le nombre de bactéries induites. On voit que le rendement diminue avec la croissance résiduelle.

Cette expérience permet donc de distinguer trois phases dans la période latente du développement du bactériophage « tempéré ». Pendant la *première phase*, qui dure vingt à trente minutes sur les cent dix minutes de la période latente, une partie des synthèses bactériennes continue à s'effectuer avec une vitesse qui est de peu inférieure à celle qu'on observe chez un témoin non irradié. Pendant cette phase, l'aptitude des bactéries à synthé-

tiser certains de leurs constituants reste donc presque intacte. Pendant la *deuxième phase*, qui s'étend de la trentième à la quatre-vingt-dixième minute environ, la vitesse de ces synthèses bactériennes décroît constamment. Les bactéries perdent donc graduellement la capacité d'effectuer leurs propres synthèses. Pendant la *troisième phase*, c'est-à-dire après la quatre-vingt-dixième minute, les synthèses bactériennes sont impossibles.

Il est donc possible que ces trois phases soient liées aux différents stades de la multiplication du bactériophage. On pourrait

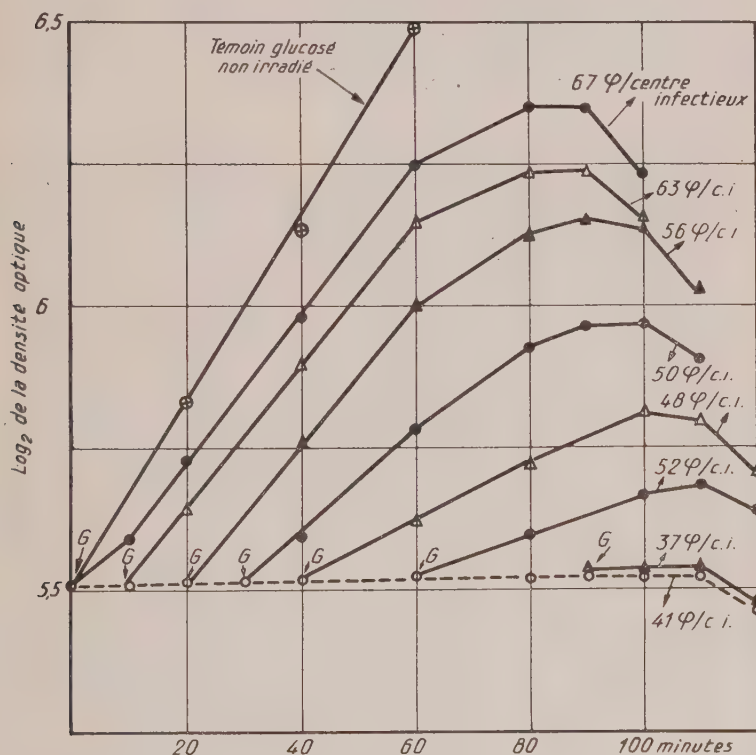


FIG. 8. — Croissance bactérienne en présence d'un excès de glucose chez une culture lysogène irradiée de 13(8) A. Une suspension arrêtée standard de 13(8) A contenant du lactose est irradiée pendant quarante-cinq secondes à 1 mètre. On ajoute de la lactase à la concentration de 1 pour 6 000. La culture est agitée à 37°. Toutes les dix minutes, un échantillon est prélevé qui reçoit un excès de glucose (3 pour 1 000). En abscisse, le temps en minutes. En ordonnée, le \log_2 de la densité optique. La courbe en pointillé correspond à la culture alimentée par le système lactose-lactase 1 pour 6 000. Les traits pleins correspondent aux échantillons qui reçoivent un excès de glucose à temps variable. Les rendements en bactériophages sont obtenus en rapportant le nombre des centres infectieux mesurés à la fin de chaque lyse au nombre de bactéries induites.

alors les rapprocher des résultats obtenus par d'autres techniques : teneur de l'acide désoxyribonucléique chez *E. coli* B infecté par T₂ [2], ou chez *B. megatherium* lysogène après induction [5], survie des centres infectieux après action d'un rayonnement U.V. sur des « monocomplexes » *E. coli* B-phage T₂ [41] ; changement de la température des cultures d'*E. coli* B infecté par T₄ [42] ; recherche des premiers corpuscules infectieux intrabactériens [43]. L'emploi du cyanure de potassium permet, en effet, de mettre en évidence l'apparition des premières particules de phage mûr vingt minutes avant le début de la lyse chez une culture de la souche 13(8)A irradiée (expériences inédites). L'arrêt des synthèses bactériennes semble donc correspondre à l'apparition des premiers phages intrabactériens.

V. QUANTITÉS DE GLUCOSE CONSOMMÉES PAR LES BACTÉRIES PENDANT LE DÉVELOPPEMENT DES BACTÉRIOPHAGES P2 ET p8. — En l'absence de croissance bactérienne, lorsque le régime de glucose limite la vitesse de synthèse du phage, on peut chercher à se former une idée des quantités d'aliment carboné consommées par les bacté-

TABEAU III. — Quantités de glucose consommées par les bactéries 13 (8) A pendant la multiplication des bactériophages P2.

Exp. n°	lactase	Bact. /ml $\times 10^6$	PLM en min.	DO témoin (9)	Glucose/bact.		Rende- ment en φ
					en mol. $\times 10^8$ (1)	(2)	
1	I/6.000	57	40	3	6,8.	6,1.	52
	I/12.000	"	60	3	6,7.	6,1.	
	I/24.000	"	100	3	4,5.	6,1.	38
2	I/6.000	62	45	4	7,1.	6,5.	44
	I/8.000	"	50	3	5,9.	4,9.	
	I/10.000	"	60	4	5,7.	6,5.	
	I/12.000	"	70	2	5,5.	3,2.	31
3	I/12.000	59	65	4	5,7.	7,9.	37
	I/24.000	"	110	3	4,6.	5,9.	28
Moyenne					5,7.	5,9.	

(9) L'augmentation de la densité optique du témoin non infecté est exprimée en divisions de électrophotomètre.

(1) Consommation de glucose par bactérie, calculée d'après le débit de la lactase.

(2) Consommation de glucose par bactérie, calculée d'après l'augmentation de la densité optique du témoin non infecté.

TABLEAU IV. — Quantités de glucose consommées par les bactéries 13 (8) A pendant la multiplication des bactériophages p8.

Exp. n°	lactase	Bact. /ml $\times 10^6$	PLM en min.	DO témoin (*)	Glucose/bact.		Rende- ment en %
					en mol. (1)	$\times 10^9$ (2)	
1	I/6.000	61	200	13	3,2.	2,5.	53
2	I/6.000	67	210	14	3,1.	2,5.	44
3	I/6.000	52	180	13	3,4.	2,9.	51
	I/8.000	"	200	13	2,8.	2,9.	
	I/10.000	"	240	14	2,7.	3,1.	48
	I/12.000	"	310	11	2,8.	2,4.	43
4	I/6.000	59	190	15	3,1.	3,0.	32
	I/12.000	"	300	13	2,5.	2,5.	35
	I/24.000	"	410	12	1,7.	2,3.	29
5	I/12.000	71	320	18	2,2.	3,0.	
	I/24.000	"	510	16	1,8.	2,6.	
6	I/6.000	64	200	14	3,0.	2,5.	50
	I/8.000	"	220	12	2,5.	2,2.	
	I/12.000	"	300	12	2,3.	2,2.	46
	I/24.000	"	420	11	1,6.	2,0.	
Moyenne					2,6.	2,6.	

(*) L'augmentation de la densité optique du témoin non irradié est exprimée en divisions de l'électrophotomètre.

(1) Consommation de glucose par bactérie, calculée d'après le débit de la lactase.

(2) Consommation de glucose par bactérie, calculée d'après l'augmentation de la densité optique du témoin non irradié.

ries pendant la biosynthèse des phages. Le calcul peut être fait de deux façons différentes :

1° On sait que le glucose est libéré à vitesse constante par le système lactose + β -galactosidase. On connaît le débit d de glucose libéré par une dilution donnée de l'enzyme. La quantité de glucose consommée par les bactéries pendant un temps donné t est donc le produit $d \times t$. Pour le temps on a choisi arbitrairement la P. L. M.

2° On peut admettre [cf. 9] que, dans un milieu où l'aliment carboné est le seul facteur limitant la croissance, le rende-

ment en bactéries est indépendant du taux de croissance, mais proportionnel à la quantité d'aliment carboné utilisable. Or, 1 mg de glucose par millilitre de milieu permet à la souche 13(8)A une croissance qui correspond en moyenne à une augmentation de 287 unités de densité optique. En mesurant, pour chaque régime, l'accroissement de densité optique présenté pendant la P.L.M. par les témoins non infectés, on peut calculer les quantités de glucose utilisées par les bactéries infectées pendant le développement du phage.

Ces deux méthodes permettent d'obtenir des résultats très voisins. Les calculs effectués d'après les données fournies par plusieurs expériences sont résumés dans le tableau III pour le phage virulent P2 et dans le tableau IV pour le phage tempéré p8. Au début de chaque expérience, un étalement sur gélose a donné le nombre de bactéries viables. Les résultats sont exprimés en molécules de glucose par bactérie. Dans les conditions de nos expériences, on peut considérer qu'il faut environ 6.10^8 molécules de glucose pour qu'une bactérie 13(8)A produise une quarantaine de bactériophages P2, et $2,5.10^9$ molécules de glucose pour qu'elle produise une cinquantaine de bactériophages p8. Ces résultats ne représentent qu'une moyenne, certainement supérieure aux besoins réels du système, car, avec les grandes dilutions de lactase, des quantités plus faibles de glucose permettent encore la production de bactériophages. Il est donc difficile de savoir quelle fraction de la quantité totale du glucose consommé correspond aux synthèses de phages proprement dites.

Dans le milieu employé pour ces expériences 1 mg de glucose permet en moyenne la production de 350.10^6 bactéries de la souche 13(8)A. Il faut donc environ 10^{10} molécules de glucose pour permettre à une bactérie de doubler. Ainsi les bactéries consomment beaucoup moins de glucose pour la reproduction des bactériophages que pour une croissance correspondant à un doublement.

DISCUSSION.

Dans les conditions habituelles de culture, lorsque aucun des facteurs du milieu n'est limitant, le développement des deux types de bactériophages étudiés interfère de façon différente avec le métabolisme des bactéries-hôtes : le développement du phage tempéré permet à la bactérie d'effectuer certaines synthèses, qui sont inhibées par celui du phage virulent.

Par contre, lorsqu'on réduit le taux du glucose utilisable par les bactéries-hôtes, les deux systèmes présentent un certain nombre d'analogies. Dans les deux cas, la diminution progressive du régime carboné limite la croissance des bactéries témoins non infectées bien avant qu'elle ne modifie la vitesse de reproduction

des phages chez les bactéries infectées ou irradiées. Le métabolisme du glucose chez les bactéries infectées peut donc être réduit jusqu'à un certain *niveau*, sans autre effet sur la multiplication des phages qu'une diminution du rendement moyen. Ce niveau est commun aux deux systèmes utilisés dans nos expériences, car dans les deux cas, c'est pour les mêmes dilutions de lactase que l'on observe une augmentation de la durée de la période latente. Les deux systèmes se comportent alors de façon analogue puisque, à ce niveau, la croissance résiduelle des bactéries irradiées est également supprimée pendant la reproduction des phages tempérés. Au-dessous de ce niveau, les régimes carbonés plus faibles deviennent limitants pour la synthèse des deux types de phages.

Lorsque le régime carboné utilisable par les bactéries devient supérieur au niveau ainsi défini, les deux systèmes présentent des différences importantes. Dans les deux cas, les bactéries oxydent un surplus de glucose. Mais alors que ce surplus de glucose oxydé est utilisable pour certaines synthèses bactériennes pendant le développement du phage tempéré, il ne l'est pas pendant le développement du phage virulent. Dans ce dernier cas, l'équipement enzymatique que possède la bactérie au moment de l'infection continue, en présence d'un excès de glucose, à oxyder celui-ci à vitesse maxima. Mais une faible part de ces oxydations est utilisée pour la biosynthèse du phage. L'absence de croissance bactérienne pendant la multiplication du phage virulent n'est donc pas due au manque d'aliment carboné, puisque celui-ci est oxydé en excès. Elle semble être provoquée par l'interférence du phage sur quelque système enzymatique de la bactérie. Au contraire, l'interférence du phage tempéré sur le métabolisme bactérien est beaucoup plus discrète et progressive, puisque les bactéries ne perdent que graduellement la faculté d'assurer certaines de leurs synthèses propres.

Le niveau défini plus haut correspond au plus faible régime de glucose permettant aux bactéries de produire des bactériophages sans augmentation de la durée de la période latente, c'est-à-dire dans le délai minimum. On a vu que la diminution progressive du régime diminue le rendement moyen en phages bien avant d'augmenter la durée de la période latente. La durée de la période latente, dont la fin est marquée par le début de la lyse et la libération de bactériophages, dépend en réalité de deux phénomènes : la multiplication des bactériophages et la lyse des bactéries. On sait, en effet [12], qu'à certains stades ces deux processus peuvent en partie être dissociés. Il est possible que la diminution du régime carboné affecte dans une certaine mesure la synthèse des phages sans modifier les processus de lyse. Deux faits sont en accord avec cette hypothèse : d'abord, quand on emploie des régi-

mes qui augmentent la durée de la période latente, et quand on double la dilution de l'enzyme, la P.L.M. n'est multipliée que par un facteur 1,5 à 1,7 ; ensuite, pendant presque toute la durée de la période latente, l'addition de glucose à une culture soumise à un régime correspondant au « niveau » permet d'accroître le rendement moyen en phages.

Comme on l'a déjà vu, le taux de croissance des bactéries témoins non infectées est réduit par des régimes carbonés qui n'affectent pas la durée de la période latente chez les bactéries infectées : lorsque la lactase est diluée à 1/6 000, les durées des périodes latentes des deux phages sont peu ou pas modifiées, alors que les bactéries témoins doublent en cinq cents ou six cents minutes, au lieu de soixante-deux à soixante-cinq en présence d'un excès de glucose. Ce résultat peut être rapproché d'un phénomène observé depuis longtemps [14] : le taux de croissance bactérien passe de 1 en milieu synthétique minimum à 3 en milieu complexe (bouillon). Au contraire, dans les mêmes conditions, la durée de la période latente minima varie relativement peu pour un phage donné. En milieu minimum, le rendement moyen en phages est généralement plus petit qu'en bouillon, de même qu'il est plus petit en régime carboné faible qu'en présence d'un excès de glucose. On admet qu'en milieu minimum la croissance bactérienne est limitée par les réactions qui permettent aux bactéries de synthétiser les métabolites essentiels. On peut concevoir cependant que la vitesse de ces synthèses en milieu minimum ne ralentisse pas la multiplication des phages. La production des métabolites essentiels pourrait être supérieure à un certain « niveau » permettant aux bactéries de synthétiser les constituants des bactériophages dans le délai minimum représenté par la durée de la période latente minima. Celle-ci ne serait donc pas influencée par la nature du milieu de culture, si l'on considère des bactéries adaptées à ce milieu. En présence d'un « excès » de ces métabolites essentiels, le rendement en phages serait accru. C'est ce qui a été observé [15] après l'addition de certains acides aminés au milieu minimum. C'est ce que l'on observe également si, au cours de la période latente, on ajoute du glucose à une culture soumise à un régime carboné faible.

RÉSUMÉ.

1° Grâce à l'emploi du système lactose + β -galactosidase, des cultures de *Pseudomonas pyocyanea*, qui n'utilisent ni le lactose ni le galactose comme substrat carboné, ont été alimentées en glucose selon un régime continu et réglable. Pour certaines concentrations des bactéries et de l'enzyme, la croissance est

linéaire, c'est-à-dire que l'accroissement de substance bactérienne par unité de temps est constant.

2° Même en présence d'un excès d'aliment carboné, la densité optique et l'intensité respiratoire restent constantes dans les cultures de la souche 13(8)A infectées par des bactériophages « virulents » P2.

Si l'on réduit au tiers la consommation maxima de glucose, la durée de la période latente n'est pas modifiée, le rendement moyen en bactériophages est légèrement diminué.

Au-dessous de ce niveau, l'emploi de régimes carbonés faibles augmente la durée de la période latente et celle de la lyse, mais les bactéries produisent toujours des bactériophages. Il n'y a pas de relation simple entre le régime et le rendement en phages.

3° En présence d'un excès d'aliment carboné, les bactéries lysogènes induites ou les bactéries sensibles infectées par le phage « tempéré » p8 présentent une croissance résiduelle et une augmentation de l'intensité respiratoire au cours de la période latente.

Si l'on réduit le régime carboné, la croissance résiduelle des bactéries irradiées peut être diminuée ou même supprimée, le rendement moyen en phages abaissé, sans qu'il y ait augmentation importante de la durée de la période latente.

Des régimes carbonés plus faibles augmentent la durée de la période latente et de la lyse, mais les bactéries produisent toujours des bactériophages.

4° La capacité des bactéries à effectuer certaines synthèses, quand elles disposent d'un excès de glucose, varie pendant le développement du bactériophage p8. Au cours des vingt ou trente premières minutes (sur une période latente de cent dix minutes), les bactéries peuvent effectuer ces synthèses à un taux légèrement inférieur à celui d'un témoin non induit. Entre la trentième et la quatre-vingt-dixième minute, le taux de synthèse décroît graduellement. Après la quatre-vingt-dixième minute, les bactéries sont incapables d'effectuer ces synthèses.

5° Avec la souche 13(8)A de *P. pyocyanea*, il faut fournir environ 10^{10} molécules de glucose pour qu'une bactérie double, 6.10^8 molécules de glucose pour qu'une bactérie produise une quarantaine de bactériophages « virulents » P2 et $2,6.10^9$ molécules de glucose pour qu'une bactérie produise une cinquantaine de bactériophages « tempérés » p8.

6° Les analogies et les différences observées dans le métabolisme des bactéries soumises à des régimes carbonés faibles pendant la multiplication des deux types de phages sont discutées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. S. COHEN et T. F. ANDERSON. *J. exp. Med.*, 1946, **84**, 511.
- [2] S. S. COHEN. *J. Biol. Chem.*, 1948, **174**, 281.
- [3] J. MONOD et E. WOLLMAN. *Ces Annales*, 1947, **73**, 937.
- [4] A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et N. KJELDGAARD. *Ces Annales*, 1950, **79**, 815.
- [5] L. SIMINOVITCH et S. RAPKINE. *Ces Annales*, 1952 (sous presse).
- [6] F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1780.
- [7] F. JACOB. *Ces Annales*, 1952, **82**, 433.
- [8] M. COHN et J. MONOD. *Biochim. Biophys. Acta*, 1951, **7**, 153.
- [9] J. MONOD. *Ann. Rev. Microb.*, 1949, **3**, 371.
- [10] F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1605.
- [11] S. E. LURIA et R. LATARJET. *J. Bact.*, 1947, **53**, 149.
- [12] O. MAALOE. *Acta Pathologica*, 1950, **27**, 680.
- [13] A. H. DOERMANN. *Carnegie Inst. of Wash. Year Book*, 1948, **47**, 176.
- [14] S. BENZER et al. In « Viruses 1950 », California Institute of Technology, Pasadena.
- [15] S. S. COHEN. *J. Biol. Chem.*, 1948, **174**, 281.

FLORE INTESTINALE DES SUJETS TRAITÉS PAR LES ANTIBIOTIQUES

par J. BRISOU et A. ARDISSON (*).

*(Ecole d'Application des Médecins de la Marine,
Hôpital Sainte-Anne, Toulon.)*

Le large emploi des antibiotiques par la voie orale a révélé la fréquence relative d'accidents cutanés, muqueux ou digestifs, chez les sujets traités. On a tenté d'expliquer ces phénomènes en faisant appel à diverses hypothèses. Les uns ont parlé de biotropisme ; d'autres ont mis les incidents sur le compte de la suppression brutale d'une flore intestinale, normalement grande pourvoyeuse en facteurs de croissance ou en ferments.

La contribution à l'étude de ce problème de biologie générale que nous présentons ici est basée sur l'examen de 20 selles provenant de malades variés, traités par les antibiotiques les plus courants : chloromycétine, auréomycine et streptomycine. Les deux premiers ont toujours été administrés par la voie orale. L'administration de la streptomycine est précisée dans le tableau I. Pour chaque malade nous avons, en fin de traitement, établi un bilan aussi complet que possible de la flore intestinale.

TECHNIQUE.

Les selles étaient examinées le matin du dernier jour de traitement, qui durait en moyenne six à dix jours.

Pour chaque échantillon on pratiquait : une coloration de Gram ; un enrichissement en milieu de Müller-Kauffmann, suivi d'un repiquage sur SS ; une culture directe sur milieu SS ; un ensemencement en gélose profonde d'une émulsion non chauffée (technique des 10 tubes) ; un ensemencement en gélose profonde (10 autres tubes) d'une émulsion de selles chauffées quarante-cinq secondes à 100° (anaérobies sporulés).

Nous résumons les résultats de ces recherches dans deux tableaux d'ensemble.

Les examens directs ont le plus souvent montré une grande

(*) *Société Française de Microbiologie*. Séance du 3 janvier 1952.

pauvreté de la flore microbienne intestinale des sujets soumis aux traitements antibiotiques. Grande pauvreté qualitative et quantitative. En général les espèces Gram-positives dominent l'image microscopique. L'isolement constant d'Entérobactériacées tient aux procédés particulièrement sélectifs dont nous avons fait usage pour les dépister. Elles n'offrent donc ici qu'un intérêt qualitatif.

Le tableau I montre que les germes les plus fréquemment sélectionnés, c'est-à-dire ceux que l'on rencontre le plus souvent, appartiennent au groupe des *Proteus*.

TABLEAU I. — Principales espèces isolées en fonction de l'antibiotique.

GERMES	C. H. M. (8)	A. M. (8)	S. T. (4)
<i>Proteus</i> . { <i>Mirabilis</i>	3	3	1
{ <i>Vulgaris</i>		1	
{ <i>Morgani</i>	2	4	1
{ <i>Reitgerii</i>	1	1	
<i>Coliformes</i> . { <i>Escherichia</i>	2	2	3
{ <i>Aerobacter</i>		2	1
{ <i>Ball-Beth</i>		1	2
{ <i>Atypiques</i>	1		
<i>St. faecalis</i>	1	5	3
<i>Anaérobies</i> . { <i>Clostridium</i>	2		1
{ <i>Spherophorus</i>	1		
{ <i>Corynebacterium</i>	2		
{ <i>Eubacterium</i>	2		1

On retrouve des *Proteus* chez 12 malades, soit 60 p. 100, avec un total de 17 souches où domine l'espèce *Mirabilis*.

Les coliformes ont, eux aussi, été retrouvés dans 60 p. 100 des cas avec un total de 14 souches. Ceci est peu lorsque l'on pense à l'extraordinaire richesse en coliformes de la flore intestinale normale. Nous avons isolé quelques espèces peu courantes appartenant aux groupes *Ballerup-Bethesda* ou *Alkalescens-Dispar*. (Nouvelle classification de Kauffmann, 1951).

Streptococcus faecalis vient ensuite ; on le retrouve chez 45 p. 100 des malades.

Le tableau II souligne l'éradication totale de la flore anaérobie par l'auromycine. Par contre, on retrouve constamment des germes de ce groupe chez les malades soumis à la chloromycétine, et parfois aussi chez ceux qui ont été traités par la streptomycine. Il

TABLEAU II.

NUMÉRO	TRAITEMENT suivi	FLORE		
		Bactérioscopie	Aérobies	Anaérobies
1	C. H. M. 30 g (1)	R > B	<i>St. faecalis.</i> <i>Esch. coli.</i>	<i>Welch. perfringens.</i>
2	A. M. 12 C. H. M. 22	R > B	<i>Esch. coli.</i> <i>St. faecalis.</i> <i>Providencia.</i>	
3	A. M. 28 g Pénicilline. Sulfamides.	B ++	<i>Proteus morgani.</i> <i>Proteus rettgerii.</i>	
4	A. M. 28 g Pénicilline. Sulfamides.	B	<i>St. faecalis.</i> <i>Pr. vulgaris.</i> <i>Aerobacter.</i> <i>Ps. aeruginosa.</i>	
5	A. M. 6 g	B	<i>St. faecalis.</i> <i>Pr. morgani.</i> <i>Pr. vulgaris.</i> <i>Pr. mirabilis.</i>	
6	S. T. (<i>per os</i>) 3 g	B ≠ R	<i>Bethesda.</i> <i>Pr. mirabilis.</i> <i>Providencia.</i> <i>Esch. coli.</i> <i>St. faecalis.</i>	
7	A. M. 10 g	B	<i>St. faecalis.</i> <i>Pr. mirabilis.</i>	
8	S. T. 14 g (<i>per os</i>).	B ≠ R	<i>Aerobacter.</i> <i>Pr. morgani.</i> <i>St. faecalis.</i>	
9	S. T. Transcutané 14 g	R > B	<i>St. faecalis.</i> <i>Esch. coli.</i> <i>Aerobacter.</i>	<i>Clostridium</i> non pathogène.
10	C. H. M. 24 g	B	<i>Pr. mirabilis.</i>	Corynebactérie.
11	S. T. 16 g Percutané.	B > R	<i>Esch. coli.</i> <i>S. ballerup.</i>	<i>Eubacterium.</i>

(1) C. H. M., Chloromycétine; A. M., Auréomycine; S. T., Streptomycine; R, rouge; B, blanc.

NUMÉRO	TRAITEMENT suivi	FLORE		
		Bactérioscopie	Aérobies	Anaérobies
12	C. H. M. 10 g	B > R	<i>Pr. mirabilis.</i> <i>Esch. coli.</i> <i>St. hémolytique.</i>	Corynebactérie.
13	A. M. 14 g	B (particulièrement pauvre).	<i>Microc. freudenreichii.</i> <i>Pr. morgani.</i> <i>Pr. rettgerii.</i>	
14	A. M. 12 g.	R ≠ B (flore très pauvre).	<i>Alkalescens.</i> <i>Pr. morgani.</i>	
15	A. M. 13 g (Suppositoires).	B = R	<i>Esch. coli.</i> <i>S. ballerup.</i> <i>St. fæcalis.</i>	
16	C. H. M. 31 g	B ≠ R (très pauvre).	<i>Alkalescens.</i>	<i>Spherophorus</i> (<i>siccus</i>). <i>Eubacterium</i> (type <i>ventriosum</i>).
17	C. H. M. 25 g	R > B	Coliforme contenant antigène B de 111 B. 4 + + et 5 B. 5 +.	
18	A. M. 12 g	B	<i>Klebsiella.</i> <i>Pr. mirabilis.</i> <i>St. fæcalis.</i> <i>Microc. albus.</i>	
19	C. H. M. 12 g + A. M. et pénicilline.	B (très rare)	<i>Bacteridium</i> (type <i>mycoides</i>). <i>Aerobacter.</i>	<i>Eubacterium.</i>
20	C. H. M. 12 g + A. M. et pénicilline.	B (très pauvre).	<i>Ec. epidermidis.</i> <i>Pr. morgani.</i> <i>Pr. mirabilis.</i> <i>St. fæcalis.</i>	<i>Eubacterium.</i>

faut noter toutefois que les anaérobies courants de la flore intestinale normale, comme *Cl. perfringens*, ont disparu chez 18 malades sur 20. Les espèces anaérobies les plus fréquemment isolées appartenaient soit aux Corynebactéries, soit aux *Eubacterium*. D'autres espèces plus rares (*Spherothorus*) n'ont été vues qu'une fois.

Aucune *Shigella*, aucune *Salmonella* n'ont pu être mises en évidence, même chez les convalescents d'infections typhoïdiques.

CONCLUSIONS.

Ce bilan permet de mettre l'accent sur le profond déséquilibre de la flore intestinale des sujets soumis aux traitements antibiotiques. Les examens directs, les cultures, montrent la pauvreté qualitative et quantitative des échantillons prélevés le dernier jour du traitement.

Il faut souligner la fréquence des *Proteus* et de *St. faecalis*. Les coliformes, normalement toujours présents et appartenant à des espèces variées pour un même sujet, n'ont été retrouvés que dans 60 p. 100 des cas et en nombre très restreint pour chaque individu.

L'auréomycine fait disparaître les anaérobies.

La chloromycétine et souvent la streptomycine en respectent certains. Elles les sélectionnent en faisant disparaître les plus courants et surtout celui que l'on doit normalement isoler de toutes les selles, *Cl. perfringens*.

L'un de nous a déjà montré les incidences cliniques de ces sélections microbiennes par les antibiotiques [1]. Il faut rapprocher aussi les résultats que l'on vient d'exposer de l'expérimentation réalisée sur le jeune chat et le cobaye par L. Carrère et J. Roux [2] dans laquelle les auteurs insistent sur la sélection du *Proteus* chez le cobaye et de l'entérocoque chez le chat.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BRISOU, *Presse méd.*, 1952, **60**, 353 et *Bull. Acad. Méd.*, 1952, **136**, 116.
[2] L. CARRÈRE et J. ROUX, *Ces Annales*, 1951, **81**, 3.

ETUDE BIOCHIMIQUE DU RENDEMENT MATÉRIEL DE CROISSANCE D'UNE BACTÉRIE AÉROBIE *BACILLUS MEGATHERIUM*

II. — ÉTUDE DE LA CROISSANCE SUR GLUCOSE

par J.-P. AUBERT.

(*Institut Pasteur, Service des Fermentations.*)

Une publication précédente, où nous avons exposé dans quel esprit cette étude du rendement avait été entreprise, traite de l'aspect analytique de la question, c'est-à-dire de l'étude des principaux constituants cellulaires des bactéries et plus précisément de celle des constituants glucidiques [2]. Le présent mémoire, par l'analyse des échanges matériels au cours du développement microbien, intéresse la physiologie des phénomènes de synthèse liés à la croissance.

TECHNIQUES UTILISÉES. — Le milieu nutritif est chimiquement défini [2], les cultures sont faites dans des fioles coniques de 1 l contenant 100 ml de liquide. Ces fioles sont fixées dans une étuve à 31° sur un agitateur mécanique.

Lors des analyses, la masse microbienne est déterminée par pesée ; on dose les polyosides par hydrolyse acide [2], le lipide β -hydroxybutyrique par la méthode de Lemoigne [16], l'azote par la microméthode de Kjeldahl. Dans le liquide, le glucose est dosé par les méthodes de Bertrand ou de Shaffer-Hartmann.

A. — PREMIERS RÉSULTATS.

L'emploi du nitrate comme aliment azoté détermine une augmentation du pH au cours de la croissance. On a donc intérêt à choisir un pH initial aussi bas que possible pour éviter une alcalinisation trop forte.

Le tableau I et la figure 1 rapportent les résultats d'une expérience type (exp. I).

TABLEAU I.

Les résultats sont exprimés en mg pour 100 ml de milieu. Les abréviations suivantes seront toujours employées: G.R., glucose restant; G.C., glucose consommé; M.S., matière sèche; P., polyside; L., lipide; N., azote; p. 100, pour 100 mg de matière sèche; Rdt, rendement.

Temps	G.R.	G.C.	M.S.	P.	L.	N.	P %	L %	N %	Rdt	pH
0	1926	0	-	-	-	-	-	-	-	-	5,7
12 h	1800	126	67	-	-	-	-	-	-	0,53	5,8
14	1489	437	228	43	64	14,0	18,9	28,0	6,1	0,52	6,2
16	941	985	531	103	146	32,6	19,4	27,3	6,1	0,54	7,0
18	465	1461	745	138	213	46,2	18,5	28,6	6,2	0,51	7,5
20	125	1801	841	160	236	53,6	19,0	28,1	6,4	0,47	7,8
23	0	1926	778	-	-	-	-	-	-	0,40	8,0

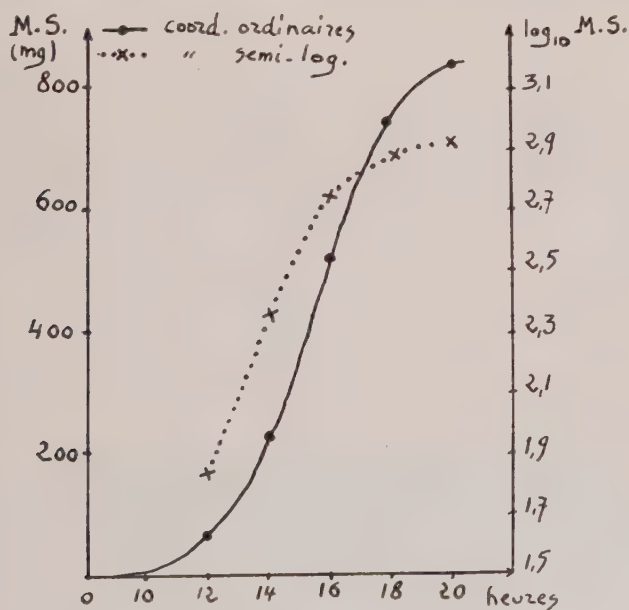


FIG. 1.

De ces résultats il ressort que :

1° La croissance cesse d'être exponentielle bien avant l'épuisement total de l'aliment carboné. Le taux de croissance, au début

de l'ordre de 0,8, diminue régulièrement à partir de la quinzième heure. Ceci est vérifié en suivant la croissance par néphélométrie ; le taux de croissance ne demeure constant que jusqu'à la consommation d'environ 500 mg de glucose dans 100 ml de milieu. Aucun des constituants du milieu ne peut cependant jouer, à ce moment, le rôle de facteur limitant.

2° Le rendement est pratiquement constant lors des premières analyses, il diminue en fin de culture avant la disparition du glucose et la formation des spores internes. (L'erreur expérimentale sur le rendement est au plus de 3 p. 100, toute différence entre deux valeurs supérieure ou égale à 6 p. 100 est donc significative.)

3° Les microbes conservent, au cours du développement, une composition constante.

On sait, depuis les travaux de Monod [19], que la croissance exponentielle est liée à l'invariabilité du rendement. Il convient donc d'étudier en premier lieu les causes et les conséquences du phénomène qui perturbe ici la constance de ces deux expressions de la croissance.

B. — RÔLE DU pH.

Puisque dans l'expérience précédente la composition des microbes ne varie pas, la diminution du rendement ne s'explique que par le détournement vers des phénomènes différents de ceux de la synthèse d'une certaine partie du glucose consommé. Deux explications, *a priori*, sont plausibles : ou bien ce glucose métabolisé aboutit à la formation de produits résiduels qui diffusent dans le milieu, ou bien il est oxydé selon une conception traditionnelle qui, à côté des phénomènes de synthèse, croit à l'existence d'un phénomène d'entretien ou d'une glycolyse semblable à celle que l'on observe avec des bactéries non proliférantes. Ce chapitre traitera de la première hypothèse, le suivant de la seconde.

Parmi les divers produits résiduels signalés dans les cultures de *B. megatherium* [6, 7, 10, 11, 13], nous avons trouvé que seul l'acide acétique existait en quantité appréciable.

Le tableau II rapporte les résultats d'une expérience (exp. II) semblable à l'expérience I, mais où l'acide acétique a été dosé par la méthode de Duclaux.

Si l'accumulation d'acide acétique ne sert à rien pour la cellule, si elle traduit, par exemple, un déséquilibre entre la glycolyse et la synthèse lorsque le pH devient trop élevé, et si le rendement des mécanismes de synthèse n'est pas modifié, le rendement corrigé, qui tient compte du glucose transformé en acide acétique et qui, de ce fait, n'a pas été utilisé pour la

TABLEAU II.

Temps	G.R.	G.C.	M.S.	Ac.Acétique	Rdt	pH	Rdt corr.
0.	2002	0	-	-	-	6,4	-
14 h	1392	610	322	traces	0,52	7,5	0,52
15	989	1013	506	45	0,50	7,6	0,54
17	473	1529	675	158	0,44	7,8	0,51
19	104	1898	797	180	0,42	8,1	0,49

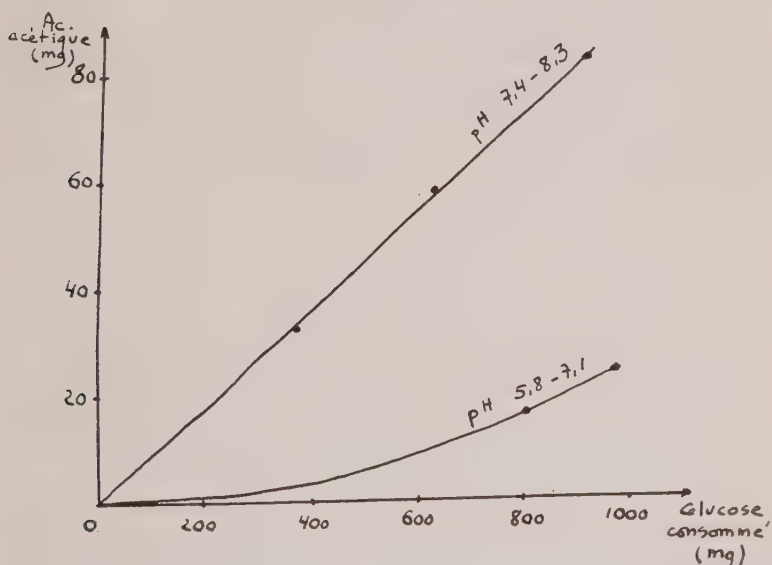


FIG. 2.

synthèse, doit être égal au rendement brut dans les conditions normales. La dernière colonne du tableau II valide cette hypothèse ; elle rapporte la valeur du rendement corrigé, en admettant que 1 mol. de glucose donne naissance à 2 mol. d'acide acétique.

Pour affirmer que la formation d'acide acétique est le résultat de la déviation du métabolisme sous l'action d'un pH élevé, il suffit de comparer deux culturesensemencées à des pH différents : l'une à pH 7,4, l'autre à pH 5,8. La figure 2 exprime l'évolution du pH et de la quantité d'acide acétique formée dans les deux cas, en fonction de la quantité de glucose consommée. On y voit que la formation d'acide acétique est bien déterminée par l'élévation du pH.

Il ressort de ce chapitre que, tant que le pH ne dépasse pas 7,0-7,2, la croissance est caractérisée par un rendement constant et la non-formation d'acide acétique. Lorsque, au contraire, le pH dépasse cette valeur limite, quelle que soit la quantité de glucose préalablement consommée, le rendement diminue et la quantité d'acide acétique devient importante. Mais comme le rendement corrigé demeure pratiquement constant, la production d'acide acétique, qui traduit un déséquilibre entre la glycolyse et la synthèse sous l'influence d'un pH élevé, n'affecte pas, tout au moins dans les limites des conditions expérimentales choisies, l'efficacité des phénomènes de synthèse. Ceux-ci fonctionnent à un rythme plus lent que dans les meilleures conditions, mais avec le même rendement.

La production d'acide acétique, étant donné la précision expérimentale, suffit presque seule à expliquer la diminution du rendement brut. Il convient toutefois, pour plus de précision, d'examiner la valeur de la seconde hypothèse émise plus haut et qui pourrait expliquer le phénomène.

C. — APPRÉCIATION DE L'IMPORTANCE D'UNE CONSOMMATION DE GLUCOSE

QUI NE SERAIT PAS DIRECTEMENT LIÉE A LA CROISSANCE.

Plusieurs travaux ont déjà été consacrés à cette étude et les résultats sont contradictoires. Certains auteurs [4, 8, 19, 21] caractérisent, à côté de la ration de croissance, une ration d'entretien. Monod [19], au contraire, pense que cette ration n'existe pas, ou tout au moins est extrêmement faible auprès de l'autre.

La méthode généralement employée, et qui n'est pas sans critique, consiste à comparer des développements microbiens à taux de croissance différents. Le principe du calcul du coefficient d'entretien proposé en premier par Duclaux [4] a été repris sous une forme légèrement différente par Terroine et Wurmser [21] et par Monod [19]. Il consiste à écrire que la quantité de glucose consommée est la somme de deux facteurs : l'un proportionnel à la masse microbienne formée (ration de croissance), l'autre proportionnel au nombre de cellules et au temps, c'est-à-dire à la surface comprise entre la courbe de croissance et l'axe des abscisses (ration d'entretien). Cette équation est :

$$Q = C \times P + E \times S$$

Q, masse de glucose consommée C, coefficient de croissance (masse de glucose nécessaire à la formation de 1 g de matière sèche microbienne); P, masse microbienne formée; E, coefficient d'entretien (masse de glucose nécessaire à l'entretien de 1 g de microbes pendant une heure); S, surface comprise entre la courbe de croissance et l'axe des abscisses (en unités gramme/heure).

La figure 3 représente deux courbes de croissance de *B. megatherium* suivies par néphélométrie ; dans un cas le pH est 5,9-6,0 (taux de croissance 0,87), dans l'autre 7,0-7,1 (taux de croissance 0,69). Dans les deux cas le développement est exponentiel ; il ne se forme dans le milieu aucun produit résiduel dosable

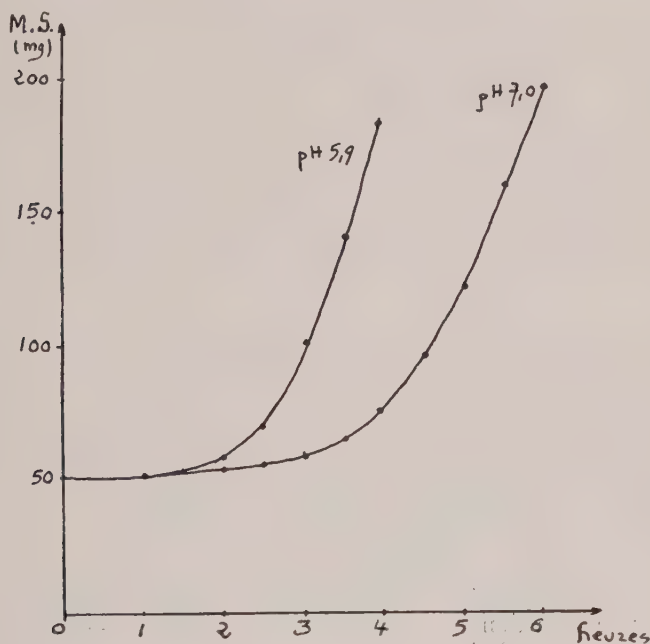


FIG. 3.

Le tableau III rapporte les analyses de la matière sèche formée et du glucose consommé, ainsi que les surfaces mesurées sur la figure 3.

TABLEAU III.

	G. initial	G.C.	M.S. formée	Surface
Exp. pH 5,9	416	258	135	0,31 g.h.
Exp. pH 7,0	416	274	142	0,48 g.h.

En calculant C et E d'après ces résultats, on trouve :

C. 1,87 g par gramme de bactéries
 E. 0,017 g par gramme de bactéries et par heure.

La validité de ces chiffres est fonction de la précision de la

méthode. Si on admet une erreur de 1,5 p. 100 pour un dosage de glucose et de 2,5 p. 100 pour une détermination de matière sèche, et si on calcule les valeurs extrêmes de E, le résultat montre que la valeur de E est comprise entre — 43 mg et + 70 mg [4].

On ne peut donc pas conclure s'il existe ou non une ration d'entretien. Ce que l'expérience autorise à dire, c'est que si cette ration existe, le coefficient E est inférieur ou au plus égal à 70 mg.

Le calcul suivant permet de juger de l'importance au cours de la croissance de ce phénomène hypothétique en admettant pour E la valeur maxima. Si on suit par néphélométrie la croissance correspondant à la consommation de 500 mg de glucose (dans 100 ml de milieu), la surface comprise entre la courbe et l'axe des abscisses est de 0,44 g/h. La ration d'entretien serait, dans ce cas, $70 \times 0,44 = 30,8$ mg et représenterait donc au maximum 6 p. 100 du glucose total consommé. On pourrait penser également qu'au cours de la croissance, une certaine partie du glucose est oxydée par un phénomène voisin, sinon semblable à celui qu'on observe avec des bactéries non proliférantes. Le QO_2 de *B. megatherium* mis dans des conditions de non-prolifération en présence de glucose est au plus de 40 μ l. C'est-à-dire qu'en une heure, 1 g de bactéries métabolisent, d'après l'équation d'oxydation totale du glucose, 53 mg de glucose. Si ce phénomène existe au cours du développement, il est proportionnel au nombre de cellules et au temps. En se rapportant à l'exemple précédent, la quantité de glucose ainsi métabolisée serait : $53 \times 0,44 = 23$ mg, soit moins de 5 p. 100 de la quantité totale dégradée.

Ces expériences et ces considérations ne permettent pas de trancher la question de l'existence ou de la non-existence des phénomènes d'oxydation non liés à la croissance, mais elles autorisent à conclure que si ces phénomènes existent, ils sont extrêmement faibles, conception qui s'accorde avec celle de Monod et qui revient à dire que dans les limites expérimentales de ce travail, pratiquement tout le glucose métabolisé est utilisé pour la synthèse et naturellement pour le fonctionnement des systèmes respiratoires qui lui sont liés.

D. — INFLUENCE DE LA NATURE DE L'ALIMENT AZOTÉ.

Avant d'être assimilable, l'aliment azoté doit parfois subir des transformations qui exigent plus ou moins d'énergie. On conçoit donc que le rendement, traduction mathématique du fonctionnement des métabolismes carboné et azoté, varie selon la nature de l'aliment azoté qui, d'ailleurs, modifie parfois la composition cellulaire. En particulier les nitrates doivent être réduits avant d'être assimilés. Si l'on fournit aux bactéries à la place d'un

nitrate un sel d'ammonium, le travail de réduction est évité ; il est important d'en connaître l'influence sur le rendement.

De nombreux auteurs [8, 9, 20, 21, 22] s'accordent à penser que la réduction de l'ion NO_3^- est liée à l'oxydation d'une quantité supplémentaire de substrat carboné, ce qui explique ou implique que le rendement soit plus faible quand l'aliment azoté est un nitrate plutôt qu'un sel d'ammonium. Nous avons cependant repris cette question dans le cas de *B. megatherium* en remplaçant dans le milieu le nitrate de potassium par la quantité équivalente en azote de carbonate d'ammonium.

a) COMPOSITION MICROBIENNE. — Les bactéries renferment en moyenne : 18,8 p. 100 de polyside, 28,1 p. 100 de lipide et 6,1 p. 100 d'azote. La composition microbienne est la même que celle des bactéries cultivées en milieu nitraté ; la comparaison est donc valable.

b) ETUDE DE LA CROISSANCE. — Au cours du développement le pH diminue, mais à cette différence d'évolution près, on observe les mêmes phénomènes que ceux rapportés précédemment dans les cultures sur nitrate. Le taux de croissance et le rendement demeurent constants et il n'y a pas formation de produits résiduels tant que la valeur du pH est supérieure à 6. Par la suite, le taux de croissance et le rendement diminuent, il y a formation d'acide acétique et le calcul du rendement corrigé indique des valeurs constantes et égales à celles du rendement brut dans les conditions normales. Mais le résultat le plus important est l'égalité des rendements sur nitrate et carbonate d'ammonium (tableau IV).

TABLEAU IV. — Rendement en présence de carbonate d'ammonium

Temps	G.R.	G.C.	M.S.	Rdt	pH
0	583	0	-	-	7,3
12 h	404	179	95	0,53	6,9
12bis	415	168	91	0,54	6,9
13	232	351	183	0,52	6,4
14	162	421	219	0,52	6,2

Or, les auteurs qui estiment que la réduction des nitrates exige la consommation d'une quantité supplémentaire de glucose admettent l'équation :



Cette équation implique une consommation de 4,28 g de glucose par gramme d'azote réduit. Le taux d'azote de *B. megatherium* (bactérie qui ne réduit que la quantité de nitrate juste nécessaire à ses besoins [14]) est en moyenne 6,2 p. 100. Si on admet la validité de l'équation ci-dessus, le rendement étant en moyenne de 0,52 sur nitrate, on devrait trouver sur carbonate d'ammonium un rendement de 0,60. Les chiffres expérimentaux n'atteignent jamais cette valeur.

D'autre part, si l'équation précédente traduit un phénomène réel, l'oxygène nitrique disparu n'entre pas dans le métabolisme général de synthèse, c'est de l'oxygène perdu, et on doit observer dans les cultures sur nitrate un dégagement de CO_2 supplémentaire. Cette hypothèse est infirmée par l'analyse des échanges gazeux (la technique en sera décrite plus loin). L'analyse, en effet, montre que pour 1 m. mol. de glucose disparu, sur carbonate d'ammonium il se forme 96 mg de matière sèche correspondant à une consommation de 2,25 m. mol. d'oxygène, alors que sur nitrate de potassium il se forme la même quantité de matière sèche correspondant à la consommation de 1,63 m. mol. d'oxygène gazeux et 0,63 m. mol. d'oxygène nitrique, soit 2,26 m. mol. d'oxygène.

Ces chiffres prouvent que l'oxygène du nitrate ne subit pas un métabolisme qui le détournerait vers la production d'un CO_2 supplémentaire. Enfin, dans une note publiée en collaboration avec d'autres auteurs [12], nous avons montré qu'en cultivant *B. megatherium* en présence de phosphate d'ammonium, non seulement les conclusions relatives à l'oxygène se retrouvent, mais qu'il n'y a pas dégagement supplémentaire de CO_2 dans le cas du nitrate. La différence expérimentale est de 8 p. 100, alors que l'équation de réduction écrite plus haut exigerait une différence de 38 p. 100.

Tous ces résultats vont à l'encontre de la conception généralement admise. On ne peut les interpréter qu'en supposant que l'oxygène nitrique sert d'accepteur d'hydrogène au même titre que l'oxygène de l'air. Ceci ne signifie pas que l'oxygène du nitrate peut remplacer pour toutes les réactions l'oxygène de l'air, puisque *B. megatherium* ne se développe pas en anaérobiose, même en présence de nitrate. Cette interprétation pose un problème énergétique qui n'a pas été résolu, mais qui existe. L'hypothèse la plus vraisemblable est que la quantité de calories dégagées au cours de la croissance, pour une même quantité de glucose consommée et dans les conditions de développement normales, est plus faible en présence de nitrate qu'en présence d'un sel d'ammonium.

E. — INTERPRÉTATION DE LA VALEUR DU RENDEMENT.

Il ressort de ce qui précède, que dans des conditions bien définies, l'aliment carboné n'est utilisé pratiquement que pour la synthèse de la matière vivante, et que si l'on tient compte de l'oxygène nitrique consommé dans le calcul de l'oxygène total, l'emploi comme aliment azoté d'un nitrate ou d'un sel d'ammonium est indifférent. Il est donc possible d'établir une répartition schématique du glucose pour la formation des principaux constituants cellulaires, et de montrer l'importance de la nature et de la proportion de ces constituants sur la valeur du rendement.

Le mécanisme de la synthèse des polyosides par *B. megatherium* n'est pas connu. Toutefois la formation du glycogène à partir du glucose a donné lieu à de nombreux travaux qui sont vraisemblablement valables ici. D'après Lipmann [47], l'énergie nécessaire à cette formation, rapportée au glucose métabolisé, est faible, et la correction ici est négligeable. L'équation de formation est donc :



Le mécanisme de formation des autres polyosides est moins bien connu. Mais c'est certainement sans grande erreur qu'on peut admettre la même équation de formation que pour le glycogène. 1 g de polyoside ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) exige la mise en œuvre de 1,10 g de glucose (rendement partiel de formation : 0,9).

Le problème de la formation du lipide β -hydroxybutyrique par *B. megatherium* n'a pas encore reçu de solution définitive. De fortes présomptions existent toutefois sur le cours des étapes de synthèse et le schéma proposé récemment par Lemoigne et coll. [45] est sans doute valable. Ce schéma se résume dans l'équation :



1 g de lipide exige la mise en œuvre de 2,09 g de glucose (rendement partiel de formation : 0,48).

L'analyse de l'ensemble des échanges matériels au cours d'une croissance normale permet, d'après ce qui a été dit plus haut, d'écrire une équation de synthèse des protéines.

Le dispositif expérimental a été légèrement modifié. Au lieu d'une fiole conique, nous avons utilisé des ballons à fond plat de 3 l, contenant 50 ml de milieu. Préalablement les limites qu'il ne fallait pas dépasser pour que les conditions d'atmosphère confinée n'interviennent pas ont été appréciées. Les ballons sont fermés hermétiquement ; ils sont munis d'une tubulure latérale contenant de l'acide phosphorique qui sert à libérer en fin d'expé-

rience le CO_2 fixé. Les gaz sont extraits à l'aide d'une pompe à mercure et analysés dans des pipettes de Doyère contenant soit de la potasse, soit du pyrogallol. Les microbes et le milieu sont soumis aux mêmes analyses que précédemment. Le tableau V exprime les résultats.

TABLEAU V.

Essais	G.C. m.mol.	M.S. mg	P. mg	L. mg	N. mg	CO_2 m.mol.	O_2 gazeux m.mol.
1	I	93	18,5	27,2	5,85	2,42	1,61
2	I	91	18,1	26,6	5,81	2,47	1,66
3	I	96	18,3	26,8	5,83	2,49	1,62
4	I	95	18,7	27,3	5,90	2,40	1,64
moyenne	I	93,7	18,4	26,9	5,85	2,44	1,63

La quantité d'oxygène nitrique consommé est : $5,85 \times 1,5/14 = 0,63$ m. mol., et la quantité totale consommée est donc 2,26 m. mol.

A la formation de 18,4 mg de polyoside correspond :

La consommation de . . . $180/162 \times 18,4 = 20,4$ mg de glucose.

A la formation de 26,9 mg de lipide correspond :

La consommation de . . . $180/86 \times 26,9 = 56,3$ mg de glucose.

L'absorption de . . . $1,5/86 \times 26,9 = 0,47$ m. mol. d' O_2 .

Le dégagement de . . . $2/86 \times 26,9 = 0,63$ m. mol. de CO_2 .

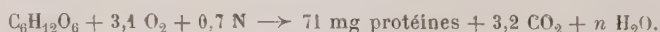
Les 93,7 mg de matière sèche microbienne contiennent 40,9 mg de protéines, et à la formation de ces 40,9 mg de protéines, correspond :

La consommation de . $180 - (20,4 + 56,3) = 103,3$ mg de glucose.

L'absorption de . . . $2,26 - 0,47 = 1,79$ m. mol. d' O_2 .

Le dégagement de . . . $2,44 - 0,63 = 1,81$ m. mol. de CO_2 .

d'où l'équation :



D'après la composition moyenne des protéines (52 p. 100 C, 7 p. 100 H, 23 p. 100 O), le bilan carboné de l'équation est 0,96 et le bilan O/R 1,26. La formation de 1 mg de protéines exige donc la mise en œuvre d'environ 2,6 mg de glucose (rendement partiel de formation 0,37).

Il serait illusoire de vouloir tirer, des trois équations qui englobent les phénomènes de synthèse et les phénomènes respiratoires, quelque conclusion sur la nature de ceux-ci. Il n'en

reste pas moins que le rendement de synthèse des trois principaux constituants sont différents : 0,9 pour le polyoside, 0,48 pour le lipide, 0,37 pour les protéines. C'est en rapprochant ces résultats d'autres expériences et d'autres données bibliographiques qu'ils prennent plus d'importance.

Quand on cultive *B. megatherium* en présence de faibles concentrations en glucose (0,05 p. 100 ou moins), la composition microbienne varie par rapport à celle observée précédemment, en particulier les taux de polyoside et de lipide diminuent (respectivement 10,6 et 19,2 p. 100) et il est remarquable que, dans ce cas, le rendement diminue également et que cette diminution s'explique par la prépondérance relative du métabolisme azoté dont le rendement partiel est le plus faible.

Si, d'autre part, on réalise une croissance totale dans un milieu où la concentration initiale en glucose est 0,5 p. 100, on observe également une diminution du taux du polyoside et du lipide ainsi que du rendement avant l'épuisement total du glucose (alors que s'il y avait eu plus de glucose au départ, l'analyse, pour la densité microbienne correspondante, eût donné des valeurs normales) : phénomène qui s'explique comme le précédent et que le calcul justifie [4]. Ce phénomène, sans doute général, est invisible si l'on travaille avec une concentration initiale en glucose de 1 p. 100 (ou plus forte) parce que la quantité de polyoside et de lipide formés est trop élevée au moment où la concentration en glucose intervient.

La généralisation de cette interprétation de la valeur du rendement eût présenté un certain intérêt, malheureusement la composition des organismes dont le rendement a été étudié est mal connue. Toutefois, *Aspergillus niger*, dont le rendement est relativement élevé (0,42) et qui le serait davantage encore si Terroine et Wurmser [21] avaient tenu compte des produits résiduels, contient, d'après Jacquot [9], 60 p. 100 de polyoside et 30 p. 100 de protéines. *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, en revanche, contiennent 10 à 11 p. 100 d'azote et se développent, d'après Monod [19], avec un rendement de 0,24. Cette valeur est d'ailleurs plus faible que la valeur du seul rendement protéique trouvé pour *B. megatherium*. Bien que pour différentes bactéries aérobies rien ne prouve que la synthèse des protéines se fasse avec des rendements égaux ou voisins, il faut certainement voir dans cette différence l'influence du choix des conditions expérimentales. Cultivée sur le milieu utilisé dans ce travail où le nitrate est remplacé par un sel d'ammonium en présence de 1 p. 100 de glucose, une souche de *B. subtilis* présente un rendement de 0,34.

Citons aussi certains travaux sur les levures. Effront [5] indique un rendement de 0,56 pour une levure cultivée sur

glucose, qui contient 49,1 p. 100 de protéines et 41,8 p. 100 de polyoside ; le rendement protéique calculé est 0,37. On trouve la même valeur avec les résultats de Claasen [3]. Menzinski [18], enfin, indique un rendement de 0,51 pour une levure cultivée sur saccharose, qui contient 48,5 p. 100 de protéines et 43,5 p. 100 de polyoside ; le rendement protéique calculé est 0,33. D'autre part, cet auteur donne des renseignements relatifs aux échanges gazeux. En calculant le nombre de molécules d'O₂ et de CO₂ mises en jeu pour la synthèse des protéines à partir de 1 mol. de saccharose, on trouve 6,5 mol. d'O₂ et 6,75 mol. de CO₂ ; ces valeurs s'accordent avec celles obtenues dans le cas de *B. megatherium*.

CONCLUSION.

La variation continue et simultanée d'un grand nombre de facteurs au cours d'une culture microbienne en milieu non renouvelé est un phénomène qui influe profondément, au delà de certaines limites, sur la croissance et le métabolisme du microbe. Bien que cette évolution ait été connue de tout temps, il faut noter que souvent on n'en a pas assez tenu compte, de sorte que, les conditions expérimentales n'étant pas suffisamment précises, les conclusions en sont d'autant restreintes.

Dans des conditions expérimentales données, l'examen de l'évolution du taux de croissance, ainsi que l'a recommandé Monod [19], est un excellent moyen de suivre l'influence des facteurs externes sur le développement microbien. S'il demeure constant, c'est que les modifications extérieures sont sans action, ce qui permet de déterminer les limites entre lesquelles tout se passe comme si les conditions extérieures demeuraient identiques. Et dans ce cas, avec *B. megatherium* :

1° La composition microbienne et le rendement demeurent constants, lorsque la concentration initiale en glucose est de l'ordre de 1 p. 100 ou plus élevée, mais cette composition varie (les composés glucidiques et lipidiques sont relativement moins importants) si la concentration initiale en glucose est plus faible (0,1 p. 100, par exemple), ce qui entraîne une diminution du rendement.

2° Il n'y a formation dans le milieu d'aucun produit résiduel.

3° Il est impossible de mettre expérimentalement en évidence l'existence d'une consommation de glucose qui ne soit pas directement liée à la croissance. Cette consommation, si elle existe, est toutefois négligeable.

4° La composition microbienne et la valeur du rendement ne dépendent pas de l'emploi comme aliment azoté d'un nitrate ou d'un sel d'ammonium, ce qui implique que pour certaines réac-

tions l'oxygène nitrique joue le même rôle que l'oxygène de l'air.

5° On peut enfin répartir schématiquement l'ensemble des échanges matériels entre les métabolismes de formation des trois principaux constituants cellulaires. On en déduit une équation de formation des protéines qui s'accorde avec les données bibliographiques sur la croissance de divers microorganismes et qui explique la variation de la valeur du rendement de *B. megatherium* dans certaines conditions.

Mais la croissance normale cesse assez rapidement, et dans nos expériences c'est le pH qui, le premier, dépasse des limites incompatibles avec l'existence d'une croissance à taux constant. Et dans ce cas, que le pH atteigne des valeurs trop élevées (supérieures à 7,2-7,3 avec le milieu nitraté) ou trop faibles (inférieures à 5,7 avec le milieu au carbonate d'ammonium) :

1° La diminution du taux de croissance est accompagnée de la formation dans le milieu de quantités appréciables d'acide acétique et le rendement diminue.

2° La composition microbienne demeure cependant constante, et si l'on tient compte de la quantité de glucose nécessaire à la formation de l'acide acétique, il est possible de calculer une valeur du rendement corrigé qui est du même ordre de grandeur que celle du rendement brut dans les conditions normales.

3° Si les valeurs du pH deviennent telles que la croissance est impossible, on observe une accumulation d'acide acétique qui peut être quantitative par rapport au glucose disparu.

En résumé, les résultats de cette étude sont de deux ordres, relatifs à la croissance et au rendement.

Dans une croissance normale, l'aliment utilisé l'est uniquement et entièrement pour la synthèse de la matière vivante. Lorsque les conditions varient, il se crée un déséquilibre entre la glycolyse et la synthèse qui aboutit à la formation dans le milieu de produits souvent appelés « de fermentation ». L'apparition de ces produits explique la diminution du rendement. Mais que le rendement corrigé soit égal au rendement brut dans les conditions normales tend à prouver que la formation de ces produits résiduels ne correspond pas au fonctionnement d'un métabolisme nécessaire à la synthèse, comme l'est celui d'un produit de fermentation d'une bactérie anaérobie. Il y a là une perte qui peut être partiellement compensée si, par la suite, le microbe est capable d'utiliser le produit résiduel. Mais ceci, qui est vrai pour les aérobies stricts, ne l'est peut-être pas pour les aérobies facultatifs.

La connaissance du taux et de la nature des principaux constituants cellulaires a permis de tirer, de la valeur du rendement, des renseignements relatifs au fonctionnement global des mécanismes de synthèse. Dans le présent travail, on a surtout présenté un exemple de méthode ; on verra, dans un prochain mémoire

relatif à la croissance de *B. megatherium* sur 2-3 butanediol, comment il est possible de déterminer les rendements de synthèse de plusieurs constituants par la comparaison du rendement de bactéries de composition différente.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J.-P. AUBERT. *Thèse de Paris*, 1950.
- [2] J.-P. AUBERT. *Ces Annales*, 1951, **80**, 644.
- [3] H. Z. CLAASEN. *Ver. deut. Zucker Ind.*, 1934 a, **84**, 713.
- [4] E. DUCLAUX. *Traité de Microbiologie*, 1900, **3**, 60.
- [5] J. EFFRONT. *Ann. Brass.*, 1926-1927, **25**, 362.
- [6] N. GRELET. *Ces Annales*, 1946, **72**, 153.
- [7] P. HEITZMANN. *Ces Annales*, 1943, **69**, 87.
- [8] S. R. HOOVER et F. E. ALLISON. *J. Biol. Chem.*, 1940, **134**, 181.
- [9] R. JACQUOT. *Biochimie et bioénergétique du Sterigmatocystis nigra*. Declume, Lons-le-Saulnier, 1936.
- [10] M. LEMOIGNE. *Ces Annales*, 1927, **41**, 148.
- [11] M. LEMOIGNE. *Helv. Chim. Acta*, 1946, **26**, 1303.
- [12] M. LEMOIGNE, J.-P. AUBERT, P. BRÉCHOT et R. TINELLI. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 1699.
- [13] M. LEMOIGNE et M. CROSON. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, **28**, 110.
- [14] M. LEMOIGNE, R. GAVARD, M. CROSON et M. LE TREIS. *Ces Annales*, 1947, **73**, 725.
- [15] M. LEMOIGNE, N. GRELET et M. CROSON. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, **32**, 719.
- [16] M. LEMOIGNE et N. ROUKHELMANN. *Ann. Ferment.*, 1940, **5**, 527.
- [17] F. LIPMANN. *Adv. in Enzym.*, 1941, **1**, 99.
- [18] G. MENZINSKY. *Ark. för Kemi*, 1950, **2**.
- [19] J. MONOD. *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann et C^{ie}, Paris, 1942.
- [20] Y. TAMIYA. *Le bilan matériel et énergétique dans les synthèses biologiques*. Hermann et C^{ie}, Paris, 1935.
- [21] E.-F. TERROINE et R. WURMSER. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, **4**, 519.
- [22] O. WARBURG et E. NEGELEIN. *Biochem. Zeitschr.*, 1920, **110**, 66.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME DES ACIDES AMINÉS SOUFRÉS, ET SPÉCIALEMENT DE LA MÉTHIONINE DANS LE SOL

par H. DE BARJAC.

(Institut Pasteur. Service de Microbie technique.
Laboratoire de Microbiologie du Sol.)

La phase d'assimilation des protéines soufrées dans le sol se résume, suivant la conception classique, en un simple passage à la forme SH_2 . Ainsi paraissait résolu, d'une manière fort simple, le problème du cycle du soufre. A l'encontre de cette conception vinrent se placer tout d'abord celle des auteurs se référant au métabolisme des composés organiques soufrés dans les tissus animaux, puis celle des auteurs qui envisagèrent l'attaque de ces composés par des souches isolées. Ainsi Masatoshi Kondo [1] signale la production de mercaptans à partir de la *L*-cystine par *E. coli* et *Proteus vulgaris*. Starkey [2], après s'être rallié à la théorie classique du SH_2 , admet l'éventualité d'un tout autre processus dans une publication récente [3]. Les travaux qu'il rapporte concernent surtout des champignons, en particulier des Euscomycètes périssporiacées du genre *Aspergillus*. Il nous a paru intéressant d'envisager les transformations d'acides aminés soufrés et spécialement de la méthionine au sein de la flore totale d'un sol, sans oublier l'arbitraire que comporte un tel examen, du fait même de la variabilité de cette flore. Cette étude, par définition, se présente donc comme la réaction d'un tout hétérogène (une terre prélevée à l'Institut Pasteur) devant un acide aminé, réaction n'impliquant pas généralisation.

I. RECHERCHE D'UN DÉGAGEMENT ÉVENTUEL DE SH_2 . — Les premières expériences faites eurent comme point de départ l'idée classique d'assimilation du cycle du soufre à celui de l'azote, quant à leur phase de minéralisation. De même que dans l'ammonification, il y a dégagement de NH_3 , il y aurait également, dans une sorte de « sulfhydrytation », dégagement de SH_2 . Nos essais montrèrent

(*) Société Française de Microbiologie. Séance du 3 janvier 1952.

une réalité différente : le cycle du soufre ne se laisse pas ramener aux normes de celui de l'azote.

Première expérience. — Application technique de l'étude de l'ammonification des substances organiques azotées à celle du catabolisme de la cystéine et de la méthionine.

50 g de sable + 0,25 de cystéine ou de méthionine sont ensemencés avec XX gouttes d'une émulsion de terre au 1/30 et introduits dans une boîte de Petri, elle-même contenue dans une grande boîte de Petri contenant 20 cm³ d'une solution de SO₄Cu, l'une au 1/10, l'autre au 1/50, l'autre au 1/100. On sait que SO₄Cu est l'absorbant spécifique de SH₂. On a ainsi trois boîtes de Petri par acide aminé + trois supplémentaires réalisées avec une dose différente d'acide aminé, soit : 0,10 par 50 g du sable ensemencé. Suivie pendant quinze jours (étuve 28°), cette expérience ne donne lieu à aucune formation de sulfure de cuivre noir.

Deuxième expérience. — Éliminant l'éventualité de perte possible de SH₂, en cas de formation, par volatilité.

Cette même terre est mise en fiole de Fourneau à raison de 50 g par fiole, et mélangée, de manière homogène, avec 0,5 g de méthionine : deux fioles sont ainsi préparées. Deux autres sont réalisées avec 50 g de sable + 0,5 g de méthionine + XX gouttes d'une émulsion de terre au 1/10. Deux autres enfin : avec 100 cm³ de milieu liquide, stérilisé à 120°, contenant p. 1 000, PO₄HK₂ : 5 ; ClNa : 2,5 ; Cl₂Mg : 0,4 ; NO₃K : 1 + 2 g de terre + 0,5 de méthionine. Chaque fiole est reliée à un barboteur contenant soit SO₄Cu au 1/100, soit de l'acétate de zinc en solution à 25 p. cent + 1 cm³ de CH³COOH. On fait passer un courant d'air continu pendant douze jours. On n'assiste pas plus à la formation de sulfure de cuivre qu'à celle de sulfure de zinc.

Ces deux expériences montrent que l'utilisation de la méthionine par la terre étudiée ne se traduit, en aucun cas, par un dégagement de SH₂.

II. RECHERCHE DES COMPOSÉS SOUFRÉS FORMÉS DANS LA TERRE MÊME. — Nous avons donc été conduite à envisager la recherche des composés soufrés formés dans la terre à l'occasion de cet apport de méthionine, et ce en aérobiose, puis en anaérobiose. Ce fut le but de deux séries d'expériences ci-dessous décrites.

Première expérience. — On prépare de grandes boîtes de Petri avec 200 g de terre bien mélangée avec 1 g de méthionine. D'autre part, deux grandes fioles reçoivent 300 cm³ du milieu liquide précité + 1,5 g de méthionine + 100 g de terre ; l'une des fioles est mise en anaérobiose, l'autre est laissée telle quelle. Les boîtes et fioles sont mises à l'étuve à 28°. On recherche chaque jour :

a) SH₂ dans l'atmosphère des fioles par un papier à l'acétate de plomb fixé au bouchon,

dans le liquide des fioles et le filtrat des terres par ce même papier au plomb, après addition d'un léger excès de SO_4H_2 dilué.

b) $\text{SO}_3 =$, $\text{S}_2\text{O}_3 =$, mercaptans dans le liquide des fioles et les filtrats après distillation en présence de SO_4H_2 dilué, par décoloration d'une solution N/1 000 d'iode.

En présence de sulfites, l'iode les oxyde en sulfates, que l'on peut alors mettre en évidence par addition de Cl_2Ba en milieu chlorhydrique. En présence d'hyposulfites, I_2 les transforme en tétrathionates ne réagissant pas avec Cl_2Ba . La recherche des hyposulfites se fera par leur transformation en hyposulfites d'argent (addition de NO_3Ag), solubles dans un excès de $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$.

La présence de mercaptans se caractérisera par la formation du mercaptide de mercure sous l'action de l'acétate de mercure.

c) SO_4 . La présence du sulfate dans la terre, antérieurement à tout traitement, présence jointe à celle des silicates, nécessite une technique spéciale pour rechercher des variations dans le taux de ces sulfates :

Au filtrat résultant d'une extraction de la terre par l'eau on ajoute V à VI gouttes de ClH . On évapore à sec à l'étuve. On reprend par quelques centimètres cubes d' $\text{OH}_2 + \text{ClH}$ et on procède comme avant. Après trois reprises et évaporations, SiO_2 se trouve insolubilisée. On reprend alors par l'eau, 5 cm^3 , on filtre, on ajoute X gouttes d'une solution de Cl_2Ba et on mesure l'opacité au photomètre en comparant avec celle donnée par un témoin : terre non traitée dont un même poids a été soumis à la même méthode.

Les résultats obtenus sont les suivants :

a) Dégagement de SH_2 manifesté par le noircissement du papier au plomb, au sixième jour après le début de la mise à l'étuve, dans la fiole en anaérobiose seulement.

b) Décoloration intense de la solution d'iode par les distillats provenant des terres, sans réaction au Cl_2Ba en milieu ClH , ni réaction au NO_3Ag pendant les cinq premiers jours de l'expérience. Il ne peut donc s'agir ni de sulfites, ni d'hyposulfites. L'odeur, fortement alliagée, en même temps que de chou pourri, développée dans tous les milieux aussi bien en aérobie que en anaérobiose,

	CHIFFRES DU PHOTOMÈTRE			
	5 ^e jour	6 ^e jour	7 ^e jour	10 ^e jour
Témoin : 280				
Aérobiose	314	327	450	575
Anaérobiose	320	325	392	390

incline à penser aux mercaptans, dont l'éthyl- et les méthylmercaptans répondent aux odeurs notées. En effet, les distillats traités par l'acétate de mercure donnent un précipité blanc de mercaptide de mercure.

c) Une augmentation des sulfates se traduit du cinquième au dixième jour, en aérobiose et en anaérobiose.

Deuxième expérience. — Répétant les mêmes gestes sur une boîte de Petri contenant 200 g de terre + 1 p. 100 de méthionine. Etuve. En comparant à un témoin on obtient :

Résultats. — a) La même odeur désagréable dès le troisième jour, le même précipité avec l'acétate de mercure. Les distillats, obtenus à partir de 30 cm³ d'eau pour 30 g de terre, sont dosés par retour. On ajoute à 5 cm³ du distillat 10 cm³ d'iode N/1 000 et S₂O₂Na₂ N/1 000. Ainsi on voit que sont utilisés par 5 cm³ d'une dilution au 1/2 de terre :

Distillats ne précipitant pas avec Cl₂Ba chlorhydrique = absence de sulfites :

Le 3 ^e jour	2,1 cm ³ d'iode N/1 000.
Le 4 ^e jour	3 cm ³ .
Le 5 ^e jour	4,9 cm ³ .
Le 6 ^e jour	5 cm ³ .
Le 8 ^e jour	5,5 cm ³ .

Distillats précipitant avec Cl₂Ba chlorhydrique = présence de sulfites :

Le 9 ^e jour	12 cm ³ .
Le 10 ^e jour	100 cm ³ .
Le 12 ^e jour	17 cm ³ .
Le 13 ^e jour	10 cm ³ .

b) Le taux de sulfates augmenté à partir du neuvième jour.

c) Le papier au plomb ne décèle pas de dégagement de SH₂.

III. RECHERCHE DE LA FORMATION DE SH₂ EN MILIEU LIQUIDE. — Enfin, nous avons clos cette série d'expériences par une recherche de SH₂ dans les milieux liquides ensemencés avec différentes terres et acides aminés.

Milieu I : milieu liquide précité

(PO₄HK₂, 5 p. 100; ClNa, 2,5 p. 100; Cl₂Mg, 0,4 p. 100; NO₃K, 1 p. 100)

réparti à raison de 1 cm³ par tube + 1 cm³ d'une solution de méthionine à 5 p. 100 : on en fait trois tubes, trois autres tubes renferment le même milieu liquide + 1 cm³ de solution de cystine à 5 p. 100.

D'autres tubes sont préparés de la même manière mais avec 1 cm³ de solution de cystéine à 5 p. 100.

Milieu 2 : milieu liquide identique, à raison de 1 cm³ par tube + 1 cm³ d'eau peptonée à 5 p. 100.

Milieu 3 : milieu liquide identique, à raison de 0,5 cm³ par tube + 0,5 cm³ d'extrait de terre + 1 cm³ de solution soit de méthionine, soit de cystine, soit de cystéine à 5 p. 100. Le tout est fait en triple exemplaire. On stérilise les tubes vingt minutes à 110°, on lesensemence avec X gouttes d'une émulsion de terre au 1/10 et on les met à l'étuve à 28°.

Deux terres TP et TG sont prélevées à l'Institut Pasteur, une troisième terre est un Poto-Poto (en provenance d'A. O. F.).

Au bout de quinze jours, on relève les tubes où le papier à l'acétate de plomb introduit lors de l'ensemencement présente un noircissement appréciable. Un tableau des réactions donne :

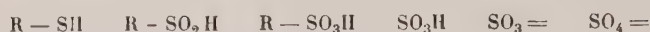
	PP	TP	TG
Milieu 1 + méthionine	0	±	0
Milieu 1 + cystéine	+	+	±
Milieu 1 + cystine	0	0	0
Milieu 2.	+	0	0
Milieu 3 + méthionine	0	0	0
Milieu 3 + cystéine	+	±	+
Milieu 3 + cystine	+	0	+

On peut retenir que la méthionine en milieu salin et avec ou sans addition d'extrait de terre ne donne généralement pas de SH₂ ; la cystéine, au contraire, en donne comme la cystine quand on l'additionne d'extrait de terre, mais la réaction reste très faible.

CONCLUSIONS.

L'introduction d'un composé organique soufré dans une terre (dans le cas spécial la méthionine) en *aérobiose* ne donne pas lieu à un dégagement de SH₂, contrairement à ce qui se passe en *anaérobiose*. En *aérobiose*, le catabolisme de l'acide aminé se traduit surtout par un dégagement notable de mercaptans, progressif en fonction du temps, par une apparition de sulfites, qui suit et accompagne celle des mercaptans. Puis, en fin d'expérience, on peut noter une augmentation du taux initial des sulfates de la terre. Il paraît donc probable que le catabolisme de la méthionine se fait suivant une suite de réactions complexes donnant naissance à des dérivés organiques du type R — SH et des dérivés minéraux du type SO₃ = et SO₄ = dont l'apparition plus tardive suggérerait l'hypothèse de leur formation à partir de dérivés organiques R — SO₂H ou R — SO₃H, eux-mêmes dérivés des formes R — SH.

Cette filiation :



reste du domaine de l'hypothèse. Des expériences basées sur la microflore totale du sol paraissent peu propres à nous faire sortir de ce domaine. Il serait nécessaire d'étudier aussi le comportement de cultures dominantes des microbes du sol en face des composés organiques soufrés, mais ce n'est pas le but de cette étude, qui est de chercher à respecter les conditions écologiques naturelles.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MASATOSHI KONDO, *Biochem. Z.* 1923, **136** 136, 198.
- [2] WAKSMAN et STARKEY, *The Soil and the Microbe*, 1931, New-York (John Wiky col.).
- [3] STARKEY, *Soil Sci.*, 1950, **70**.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 6 Mars 1952.

Présidence de M. GASTINEL

NÉCROLOGIE

CH. TRUCHE

(1871-1951)

Notre collègue Charles Truche, docteur vétérinaire, chef de Service honoraire à l'Institut Pasteur de Paris, est mort à Saint-Brévins-les-Pins (Loire-Inférieure), le 7 juillet 1951. Il était né à Arpajon, en Seine-et-Oise, le 1^{er} janvier 1871.

Diplômé de l'Ecole d'Alfort en 1893, Ch. Truche va pratiquer la médecine vétérinaire à Paris, pendant une quinzaine d'années ; mais la recherche et l'expérimentation exercent sur son esprit curieux un attrait irrésistible et c'est à s'initier aux techniques solidement établies déjà de la bactériologie qu'il consacrera bientôt les courts loisirs que lui laissent ses obligations professionnelles.

En 1909, il suit le cours de Microbiologie de l'Institut Pasteur, puis il entre dans le service de Maurice Nicolle. C'est de ce grand pasteurien qu'il tiendra sa formation bactériologique et c'est sous son inspiration qu'il accomplira ses premières études principalement consacrées au pneumocoque.

Pendant la première guerre mondiale, Ch Truche sert successivement, en qualité de vétérinaire capitaine, dans une formation du front, puis au laboratoire antityphoïdique de l'Armée, dirigé par Hyacinthe Vincent, enfin au service de Sérothérapie de l'Armée, à Alfort.

Après l'armistice, il reprend sa place à l'Institut Pasteur, dans le Service des Vaccins vétérinaires ; aux côtés de notre collègue, M. Staub, il y poursuivra pendant de nombreuses années une carrière féconde. Cette période d'après guerre voit renaître les élevages fermiers de volailles et se multiplier les grandes exploitations avicoles ; avec le retour progressif à la liberté des échanges elle se trouve être favorable

à la dissémination des contagés comme à l'introduction sur notre territoire d'affections jusqu'alors inconnues de nous. Ch. Truche saisit cette occasion d'explorer, en microbiologiste, un domaine de la médecine vétérinaire alors à peu près vierge, celui des maladies des volailles. Avec autant d'esprit de suite que de sagacité, il met à profit l'abondant matériel dont dispose son laboratoire d'analyses et ce n'est pas sans raison qu'on s'accordera désormais à le considérer comme le pionnier de la pathologie aviaire en France.

Ch. Truche avait pris sa retraite en 1947, mais, résidant à Paris, il gardait un étroit contact avec l'Institut Pasteur et manquait rarement de nous y faire sa visite quotidienne.

L'œuvre scientifique de Ch. Truche est abondante et variée. Les premiers mémoires présentés sous son nom ou qu'il signa avec M. Nicolle traitent des toxines solubles et des sérums antitoxiques. Il entreprit en même temps et poursuivit avec plusieurs collègues, et notamment M. Cotoni, d'importantes recherches sur le pneumocoque ; leurs résultats furent exposés dans toute une série de publications et finalement rassemblés en une monographie éditée en 1922.

A la même époque, l'Académie de Médecine était appelée à autoriser l'emploi du sérum antipneumococcique sur présentation d'un rapport rédigé par Truche, dans lequel il précisait le mode de préparation et les propriétés du nouveau produit.

Mais antérieurement, à l'instigation de M. Nicolle, Ch. Truche avait imaginé et mis au point un milieu de culture hautement favorable au développement du pneumocoque, le milieu T, qu'adoptèrent tous les laboratoires de microbiologie et sur la fortune duquel il serait superflu de mettre l'accent.

Nombreux furent plus tard les sujets abordés par Ch. Truche : lymphangites contagieuses des équidés, tuberculose et pseudo-tuberculose dans diverses espèces, typhose et pullorose aviaires, neuro-lymphomatoses des volailles, maladie d'Aujeszky, rouget... Ses études firent l'objet de communications justement appréciées dans les sociétés savantes, et particulièrement à l'Académie Vétérinaire de France dont il était membre.

La carrière pasteurienne de Ch. Truche fut toute d'un labeur scrupuleux, ordonné, éclairé ; ayant une bonne connaissance des langues anglaise et allemande, notre regretté collègue se tenait exactement informé du mouvement scientifique à l'étranger sur les sujets qui l'intéressaient. Un certain don d'intuition et le plus solide bon sens guidaient ses recherches.

Ch. Truche éprouvait pour la Maison de Pasteur un attachement profond ; il vouait aux maîtres qui l'y avaient accueilli une fidélité parfaite. Il était avec ses collègues d'une charmante bonhomie et témoignait à l'égard de ses collaborateurs d'une inépuisable bienveillance. C'est avec émotion que nous rendons à sa mémoire l'hommage qui lui est dû.

COMMUNICATIONS

**UNE NOUVELLE MALADIE MORTELLE DU CHIEN :
LA SEPTICÉMIE A *INFLABILIS SANGUICOLE***

par C. MAZUREK, O. et J. BAZIN et G. KARSENTI.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

Une enzootie de septicémie mortelle du chien a été observée dans les régions de Grenoble, de Rumilly et du Val-d'Isère, dans les premiers jours de décembre 1951. Vingt-trois cas ont été suivis. On a pu pratiquer 6 hémocultures qui, toutes, ont été positives. L'identification du germe anaérobie isolé a révélé qu'il s'agissait d'*Inflabilis sanguicole*. Il s'agit donc d'une nouvelle maladie du chien. Voici l'aspect clinique de cette maladie :

La maladie commence par une fièvre élevée à 40° ; en même temps se manifeste une conjonctivite séreuse qui devient rapidement purulente avec congestion intense des sclérotiques. L'animal présente de la toux pharyngée avec jetage nasal séreux devenant ultérieurement purulent. L'haleine est fétide. En peu de temps, l'animal présente une diarrhée jaunâtre, fétide, parfois sanguinolente, puis noirâtre ; il peut émettre jusqu'à 15 selles par jour. Quelques animaux ont présenté des vomissements. L'amaigrissement est constant et considérable. Après trois semaines de maladie apparaissent des crises épileptiformes, une paralysie du train postérieur, et la mort survient au bout d'une trentaine de jours. A l'autopsie on ne trouve que très peu de lésions.

En résumé, la maladie se présente comme une entérotoxémie évoluant vers une phase septicémique. Les antibiotiques employés se sont montrés absolument sans action.

L'apparition, dans un territoire limité, de cette maladie nouvelle du chien appelle un commentaire.

Nous rappelons que la souche historique d'*Inflabilis sanguicole* a été isolée par Vaucher, Boez, Lanzenberg et Kehlstadt [1] en 1925, dans une bactériémie humaine survenue chez une femme de 25 ans, et à point de départ inconnu, probablement utérin ou amygdalien. Cette observation unique n'aurait donné aucune indication sur l'écologie de ce germe. Les travaux de A.-R. Prévot et ses collaborateurs [2 et 3] à l'Institut Pasteur ont montré qu'*Inflabilis sanguicole* est un hôte normal du sol, des boues, des eaux douces, aussi bien de France que d'Afrique, et également un hôte normal de l'huître et de la carpe. Ces faits permettent de penser que les chiens ayant contracté l'entérotoxémie septicémique se sont contaminés par voie orale à partir d'aliments souillés de terre ou de boue.

La souche 698 isolée par hémoculture de cette maladie du chien était très hémolytique *in vitro* et provoquait, par injection intramusculaire

au cobaye, un gros œdème gélatineux rosé causant la mort en cinq jours. A l'autopsie, on constate que la sérosité péritonéale contenait une culture pure du germe.

Sur les 5 autres souches étudiées antérieurement dans le service des anaérobies, une seule n'était pas pathogène, les 4 autres étaient pathogènes pour le cobaye qu'elles tuent avec œdème et nécrose. Sur ces 4 souches, 3 possédaient une hémolysine active, et 1 une toxine tuant le cobaye sans provoquer de lésion macroscopique.

En résumé, il s'agit d'un germe anaérobie tellurique pathogène pouvant provoquer des viscérités, des septicémies spontanées et des myosites expérimentales, comme cela est fréquent dans ce groupe. La présente enzootie nous apporte une donnée nouvelle de pathologie comparée : l'équivalent, chez l'animal, de la maladie humaine à *Inflabilis sanguicole*.

CONCLUSIONS. — 1° Vingt-trois cas d'entérotoxémie du chien, compliqués de septicémie, ont été observés.

2° L'hémoculture a révélé qu'il s'agissait d'une maladie provoquée par *Inflabilis sanguicole*.

3° Les antibiotiques n'ont eu aucune influence sur l'évolution fatale de la maladie.

4° Il faut désormais considérer *Inflabilis sanguicole* comme un anaérobie très pathogène pouvant donner des maladies humaines et animales, et capable de sécréter une hémolysine active et parfois même une toxine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] VAUCHER, BOEZ, LANZENBERG et KEHLSTADT, cités par WEINBERG, PRÉVOT et NATIVELLE. Les microbes anaérobies, 409.
- [2] A.-R. PRÉVOT et M. RAYNAUD. Ces *Annales*, 1943, 69, 378.
- [3] A.-R. PRÉVOT. Ces *Annales*, 1948, 74, 157.

ÉTUDE DE LA PRODUCTION D'HÉMOLYSINE ET DE TOXINE SUR MILIEU A BASE DE PROTÉOLYSAT

par J. MALGRAS, R. SARTORY, J. MEYER et R. VESCHAMBRE.

(Faculté de Pharmacie de Strasbourg. Laboratoire de Microbiologie.)

Nous avons montré, dans une première note [1], l'intérêt du milieu préparé à l'aide du protéolysat en poudre pour la culture, l'isolement et l'identification des bactéries anaérobies.

Poursuivant l'étude de différents germes sur le protéolysat, nous avons pensé qu'il serait intéressant de contrôler la toxinogénèse et la production d'hémolysine.

Nous nous sommes adressés aux souches suivantes :

Plectridium tetani,

Clostridium sordellii (82),

W. perfringens (Lechien),

Cl. histolyticum (chevaux),

Cl. botulinum A,

qui ont été mises à notre disposition par le service du Dr Prévot, de l'Institut Pasteur, service dans lequel une partie des expériences a été faite.

Les premiers essais ont été effectués sur le milieu normal : protéolysat à 2 p. 100, glucosé à 2 p. 1 000, et le contrôle sur bouillon Vf glucosé à 2 p. 1 000.

1° RECHERCHE DE L'HÉMOLYSINE. — « *W. perfringens* » Lechien, cultures en tube de Hall à 37° pendant dix-huit heures.

Hémolyse obtenue sur 0,5 cm³ de globules rouges de mouton au 1/20. Protéolysat 2 p. 100 : 0,5 cm³ d'une dilution au 1/50 du liquide centrifugé provoque l'hémolyse de ces 0,5 cm³ GR, soit 100 UH par centimètre cube, tandis que 0,1 cm³ d'une dilution au 1/100 du liquide centrifugé, après culture sur Vf, hémolyse les 0,5 cm³ de GR de mouton, soit 500 UH par centimètre cube.

« *Cl. histolyticum* » chevaux. — Cultures de seize heures à 37°.

Protéolysat 2 p. 100, pas d'hémolysine.

Vf : 4 UH par centimètre cube.

Plect. tetani. — Cultures de cinquante heures à 37° (cinquante heures n'est pas le temps optimum pour la production d'hémolysine, mais ce fait n'intervient pas, puisqu'il s'agit d'un test comparatif).

Protéolysat 2 p. 100 : 0,02 cm³ du centrifugat de culture hémolyse 0,5 cm³ GR mouton au 1/20, soit 10 UH par centimètre cube.

Vf : 40 UH par centimètre cube.

Pour la production d'hémolysine, nous constatons donc une diminution extrêmement sensible du rendement sur protéolysat par rapport à celui obtenu sur Vf dans les mêmes conditions.

2° RECHERCHES SUR LA TOXINE. — Nous avons recherché la dose minima mortelle de la toxine qui était la plus petite dose tuant, en quarante-huit heures, la souris d'un poids de 20 g en injection intrapéritonéale.

On dilue le centrifugat de culture de telle manière que l'inoculation soit toujours de 0,5 cm³.

On inocule 3 souris par dose.

« *W. perfringens* » Lechien. — Cultures de vingt-quatre heures à 37°.

Sur milieu Vf : 3 souris meurent pour une dilution correspondant au 1/20 de centimètre cube sur protéolysat 2 p. 100 ; 3 souris meurent pour une dilution correspondant au 1/10.

« *Cl. histolyticum* » chevaux. — Cultures de seize heures à 37°.

Les 3 souris inoculées avec le liquide centrifugé de la culture meurent pour une dilution correspondant au 1/10 de centimètre cube tant sur Vf que sur protéolysat 2 p. 100.

Cl. botulinum A. — Nous n'avons ici recherché qu'un test compa-

ratif sans vouloir mettre en évidence la dose minima mortelle dans les conditions optimum de production de la toxine.

Cultures de trois jours à 37°.

Protéolysat 2 p. 100 : les souris meurent pour une dilution au 1/20 000 de centimètre cube.

Vf : même résultat.

Ces résultats, dans l'ensemble satisfaisants, montraient, malgré tout, une production de toxine et d'hémolysine sur protéolysat 2 p. 100 nettement inférieure à ce qu'elle est sur Vf. Cette différence apparaît nettement sur le tableau suivant :

TABLEAU I.

	Vf	PROTÉOLYSAT 2 p. 100
<i>W. perfringens</i> Lechien :		
Toxine, DMm.	1/20 cm ³	1/10 cm ³
Hémolysine, 18 heures à 37° UH/cm ³ . .	500	100
<i>Cl. histolyticum</i> chevaux :		
Toxine, DMm.	1/10	1/10
Hémolysine, 16 heures à 37° UH/cm ³ . .	5	0
<i>Plect. tetani</i> :		
Hémolysine, 50 heures à 37°	40	10
<i>Cl. botulinum</i> A. :		
3 jours à 37° DMm.	1/20 000	1/20 000

En étudiant la composition chimique sommaire du protéolysat 2 p. 100 et du Vf, nous nous aperçûmes que le taux d'azote total était nettement inférieur sur protéolysat 2 p. 100 à ce qu'il était sur Vf.

Pour obtenir un taux d'azote total équivalent, il faut s'adresser au protéolysat 5 p. 100.

Nous avons donc repris les recherches sur la toxinogénèse sur un tel milieu et obtenu les résultats résumés dans le tableau II.

Il ressort de ce dernier tableau que les résultats, tant pour la production de toxine que pour celle de l'hémolysine, sont identiques à ceux obtenus sur Vf pour un milieu protéolysat 5 p. 100.

Ces tests n'ont pas pour but de mettre en évidence la valeur absolue de la production de toxine et d'hémolysine sur protéolysat, mais, bien au contraire, de montrer que ce milieu peut répondre favorablement à une étude complète des bactéries anaérobies dans un laboratoire d'analyse, sans que les résultats pèchent par défaut pour l'une ou l'autre détermination.

En tant que milieu favorable à la toxinogénèse, dans le but de produire des anatoxines, il reste évident que le milieu Vf, qui a fait ses preuves, est celui qui doit être employé.

TABLEAU II.

	Vf	PROTÉOLYSAT 2 p. 100	PROTÉOLYSAT 5 p. 100
<i>Cl. histol.</i> , cheval :			
Toxine, DMm.	$1/8 \text{ cm}^3$	$1/8 \text{ cm}^3$	$1/10 \text{ cm}^3$
Hémolysine, 18 heures à 37° UH/cm ³	5 UH/cm^3	0	10 UH/cm^3
<i>Pl. tetani</i> :			
50 heures à 37° hémolysine.	40 UH/cm^3	10 UH/cm^3	30 UH/cm^3
<i>Cl. sordellii</i> 82 :			
16 heures à 37° hémolysine.	5 UH/cm^3	2 UH/cm^3	$5 \text{ à } 10 \text{ UH/cm}^3$

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. SARTORY, J. MALGRAS, J. TOUILLIER et R. VESCHAMBRE. *Ces Annales*, 1951, **81**, 88.

SOUS L'INFLUENCE DES IMMOBILISINES DE NELSON ET MAYER, LE *TREPONEMA PALLIDUM* PERD-IL SA VIRULENCE ?

par G. LEVADITI, A. VAISMAN et A. HAMELIN.

(Institut Alfred-Fournier.)

Les immobilisines que la séro-réaction de Nelson et Mayer met en évidence dans le sérum des syphilitiques et des lapins syphilitisés expérimentalement suppriment-elles, en même temps que le mouvement des parasites, leur pouvoir pathogène pour les animaux réceptifs ? Oui, affirment Nelson et Mayer [1], leurs conclusions étant basées sur les résultats d'essais destinés à évaluer le degré de cette suppression de la virulence pour le lapin. Il en a été de même des recherches de Thompson, Greenberg et Magnuson [2], lesquelles, par excellence quantitatives, ont prouvé que le tréponème peut perdre son pouvoir pathogène, tout en conservant, au moins en partie, sa mobilité (dissociation des deux fonctions prises en considération).

Il nous a semblé utile d'examiner le problème en nous adressant à la souris comme animal-test. Cet animal, contaminé, réagit par une tréponémose dispersive, mais cliniquement inapparente [présence de *Treponema pallidum* dans les zones électives (muqueuse nasale,

rectum, peau du dos et du périnée, ganglions lymphatiques périphériques) ; (méthode argentique de Stroesco)].

TECHNIQUE. — Des sérums de syphilitiques (*Nelson-positif*) et de sujets non contaminés (*Nelson-négatif*) ont servi à nos essais (séro-diagnostic selon la technique de Nelson et Mayer, modifiée par nos soins). Examen des résultats concernant le pourcentage des tréponèmes immobilisés à la dix-septième heure. A ce moment, inoculation des mélanges de sérum et de spirochètes en présence de complément actif ou inactif (tubes à réaction et tubes témoins), par voie sous-cutanée (0,5 cm³), ainsi que de leurs dilutions à 10⁻¹, à 10⁻² et 10⁻³. Une suspension de ces mêmes spirochètes dans le milieu de Nelson, mais sans adjonction de sérum, sert de *témoin* de la virulence. Les souris ont été sacrifiées entre cent vingt-cinq jours et cent trente-six jours après l'inoculation. Examen histologique (méthode de Stroesco) :

a) Un mélange de deux sérums *Nelson-positifs*, provenant de malades anciennement spécifiques, a été utilisé :

Sérum 156. — Lud., paralysie générale, B.-W. + + + (sérum et liquide céphalo-rachidien).

Sérum 170 — Ros..., gomme du front en 1942, B.-W. + + +, malgré des traitements intensifs.

b) Un mélange de deux sérums *Nelson-négatifs*, provenant des sujets non contaminés suivants, a été employé :

Sérum 168. — Bas..., névrite brachiale, B.-W. = négatif ;

Sérum 174. — Ho... ; B.-W. = négatif.

Les résultats enregistrés sont consignés dans le tableau ci-contre :

Ci-dessous les conclusions qui en découlent :

1° Aucune tréponémose microscopiquement apparente n'a été révélée chez les souris inoculées avec des spirochètes immobilisés au taux de 100 p. 100, en présence d'un mélange de deux sérums immobilisants, les n^{os} 156 et 170), les inoculations ayant été effectuées avec la suspension concentrée et des dilutions de 10⁻¹ à 10⁻³. *Les effets parasitocides sont apparus nettement ; l'immobilisation spécifique a donc traduit une perte de la virulence du Treponema pallidum.*

2° Par contre, dans les mélanges « témoin » des mêmes sérums (complément inactif à 56°), les tréponèmes, restés mobiles à un taux de 92 p. 100, ont provoqué une parasitose microscopique positive chez 2/2 souris inoculées avec le concentrat, chez 2/3 avec la dilution à 10⁻¹, chez 2/4 avec la dilution à 10⁻² et chez 1/5 avec la dilution à 10⁻³.

3° Tout autre a été l'effet tréponémicide du mélange des deux autres sérums humains (les n^{os} 168 et 174) pratiquement dépourvus d'immobilisines. En présence de ce mélange, les spirochètes ont conservé leur mobilité à un taux de 86 p. 100. En effet, les souris inoculées avec le concentrat se sont infectées dans une proportion de 5/5, celles contaminées avec la suspension diluée à 10⁻¹ dans une proportion de 2/4, celles qui ont reçu les dilutions à 10⁻² et 10⁻³ dans une proportion de 0/5. *Il en résulte que le Treponema pallidum, ayant conservé sa mobilité en présence de sérums humains Nelson-négatifs, continue à être virulent pour la souris, laquelle réagit par une tréponémose microscopiquement apparente.*

TABLEAU.

SÉRUMS ET TÉMOINS		THÉPOXÈMES IMMOBILES p. 100	THÉPOXÈMES MOBILES p. 100	PUR				10 - 1				10 - 2				10 - 3			
				Nombre de souris	Sacrifiées le	Présence de tréponèmes (positif)	Absence de tréponèmes (négatif)	Nombre de souris	Sacrifiées le	Présence de tréponèmes (positif)	Absence de tréponèmes (négatif)	Nombre de souris	Sacrifiées le	Présence de tréponèmes (positif)	Absence de tréponèmes (négatif)	Nombre de souris	Sacrifiées le	Présence de tréponèmes (positif)	Absence de tréponèmes (négatif)
Sérums positifs 156 + 170.	Tube réaction.	100	0	5	132° j.	0/1	5/5	5	136° et 147° j.	0	5/5	4	129° j.	0	4/4	4	125° j.	0	4/4
	Tube témoin.	8	92	2	132° j.	2/2	0/2	3	129° et 132° j.	2/3	1/3	4	132° j.	2/4	2/4	5	132° et 135° j.	1/5	4/5
Sérums négatifs 168 et 174.	Tube réacti-n.	14	86	5	129° j.	5/5	0/5	4	129° j.	2/4	2/4	5	129° j.	0/5	5/5	5	129° j.	0/5	5/5
	Tube témoin.	16	84	5	126° j.	5/5	0/5	5	126° j.	3/5	2/5	5	132° j.	1/5	4/5	4	132° j.	0/4	4/4
Suspension de Tréponèmes dans le milieu de Nelson.	Témoin.	28	72	5	134° j.	5/5	0/5	4	134° j.	1/4	3/4	5	134° j.	1/5	4/5	5	134° j.	0/5	5/5

(1) Le chiffre placé à droite du trait indique le nombre des souris utilisées, celui placé à gauche du même trait le nombre des résultats positifs.

4° Les résultats fournis par le mélange « témoin » (complément inactivé) ont confirmé ceux exposés au paragraphe 3.

5° Enfin, le transfert chez la souris des spirochètes conservés dans le milieu de Nelson-contrôle (dépourvu de sérums immobilisants ou non), dans les mêmes conditions que les mélanges examinés précédemment, a fourni des résultats positifs à l'examen microscopique.

CONCLUSION. — L'utilisation de la souris en tant que test de la virulence, appréciée selon les résultats des examens microscopiques, permet de confirmer des données analogues enregistrées grâce à l'utilisation du transfert au lapin, en ce sens que l'immobilisation du *Treponema pallidum*, réalisée selon la méthode de Nelson, implique une perte de la virulence du spirochète. Il va de soi que les sérums humains Nelson-négatifs respectent totalement l'intégrité du pouvoir pathogène du germe.

BIBLIOGRAPHIE

[1] NELSON et MAYER. *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 369.

[2] THOMPSON, GREENBERG et MAGNUSON. *J. Bact.*, 1950, **60**, 473.

MÉCANISME DE LA SUPERINFECTION DANS LA SYPHILIS EXPÉRIMENTALE DU LAPIN RELATIONS IMMUNOLOGIQUES ENTRE LES SOUCHES DE *TREPONEMA PALLIDUM*

par A. VAISMAN.

(Institut Alfred-Fournier, Service de M. C. LEVADITI.)

Lorsqu'on réinfecte un lapin guéri d'une lésion syphilitique testiculaire ou scrotale, de nouvelles lésions locales n'apparaissent pas, à condition que la réinoculation se fasse avec la même souche et au moins trois mois après la première. Par contre, lors de la réinoculation par une souche hétérologue, des résultats positifs sont souvent enregistrés, comme si l'immunité anti-chancreuse du lapin n'était qu'une mono-immunité et non, à l'instar de ce qui paraît se produire chez l'homme, une pan-immunité. Le terme de « *superinfection* » a été proposé par Marcel Pinard pour désigner le changement de réceptivité aux inoculations d'épreuve (phénomène éminemment allergique).

Nous avons étudié antérieurement [1] l'ensemble du problème de l'immunité antisypilitique et nous désirons, dans le présent travail, insister sur la variabilité des réussites des superinfections, suivant les souches tréponémiques utilisées.

Turner et Cumberland [2] utilisent 14 souches tréponémiques, dont la souche *Nichols*. Primo-infection chez le lapin, puis test avec les

souches homologues et hétérologues pratiqué le quatrième mois. Les réinoculations ont fourni des preuves plaidant en faveur d'une résistance acquise, excepté celles effectuées avec trois échantillons tréponémiques de faible activité pathogène.

Levaditi et Vaisman [3] étudient 4 souches, dont la souche *Gand* de Bessemans, qui avait subi de très nombreux passages testiculaires sur le lapin, et 3 autres isolées de l'homme à l'Institut Alfred-Fournier, et entretenues pendant un temps prolongé par des passages réguliers sur la souris, et, moins fréquents, sur le lapin. Parmi ces souches, deux étaient douées d'un pouvoir pathogène élevé (souches « fortes » : *Hub.* et *Gand*), tandis que les deux autres étaient moins constamment virulentes pour le lapin (souches « faibles » : *Pour.* et *M.*). Il résultait des essais comparés réalisés entre le quatrième mois et un an que, du point de vue de leurs qualités immunogènes, les « souches fortes » créent une immunité-chancrè des plus marquées à l'égard des souches aussi bien homologues qu'hétérologues, tandis que les souches faibles donnent une immunité-chancrè pour la souche homologue, ou une souche hétérologue faible, mais que cette immunité s'efface à l'égard d'une souche hétérologue forte.

L'immunité-chancrè est donc manifestement plus accentuée s'il s'agit de primo-inoculations effectuées avec des « souches fortes » qu'avec des « souches faibles ».

Magnuson et Thompson [4] expérimentent sur trois souches de *Treponema pallidum*, la souche *Nichols* et deux autres récemment isolées. A partir du troisième mois, tandis que le degré d'immunité de la souche homologue dépasse celui développé par les souches hétérologues, une immunité appréciable peut cependant s'établir, mais elle diffère largement en intensité suivant la souche. La protection conférée par la souche *Nichols*, plus virulente, est plus grande que celle des deux autres souches moins virulentes.

Gastinel et Collart [5] n'ont observé aucun cas de superinfection en utilisant la souche *Nichols* chez 14 lapins infectés avec la souche *Gand* depuis quatre-vingt-quatre à mille quarante-cinq jours.

Nos recherches actuelles ont pour but la comparaison des deux souches *Nichols* et *Gand*, du point de vue de leurs qualités immunogènes, selon le principe de l'immunité croisée. Ces expériences comportent 29 lapins, tous infectés par voie sous-scrotale et ayant répondu par des syphilomes dans les délais habituels. Ces lapins ont été réinfectés par la même voie, et sans avoir subi aucun traitement, avec la souche hétérologue. Les résultats sont consignés dans le tableau ci-contre.

Il résulte de ce tableau que, sur les 14 lapins primo-infectés avec la souche *Gand* et éprouvés par la souche *Nichols*, entre le soixantième et le quarante-deuxième jour, un seul lapin a répondu par un chancre.

En ce qui concerne les 15 lapins primo-infectés avec la souche *Nichols*, et dont le test d'immunité fut effectué entre le quatre-vingt-deuxième et le cent soixante-dixième jour, avec la souche *Gand*, 11 animaux ont réagi par des syphilomes.

CONCLUSIONS. — Nos essais actuels confirment que la réussite de la « superinfection » dépend du pouvoir immunisant de la souche primo-

infectante et montrent que dans le comportement réciproque des deux souches GAND et NICHOLS, la première joue le rôle d'une « souche forte » vis-à-vis de la seconde.

PRIMO-INOCULATION souche <i>Gand</i> et TEST D'IMMUNITÉ souche <i>Nichols</i>			PRIMO-INOCULATION souche <i>Nichols</i> et TEST D'IMMUNITÉ souche <i>Gand</i>		
Numéro du lapin	Intervalle entre les deux inoculations en jours	Résultat	Numéro du lapin	Intervalle entre les deux inoculations en jours	Résultat
766	60	0	713	82	0
502	100	+	900	85	+
578	100	0	505	85	0
879	173	0	515	92	+
881	173	0	173	103	0
883	173	0	809	110	+
750	220	0	59	113	+
762	220	0	981	126	0
753	229	0	882	137	+
763	229	0	888	137	+
863	229	0	889	137	+
554	400	0	890	137	+
492	442	0	836	170	+
493		0	837	170	+
			839	170	+

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. VAISMAN. *Presse Méd.*, 1946, **54**, 177.
- [2] TURNER et CUMBERLAND. « Current Progress in the Study of Ven. Dis. », 1949, p. 202 (Fed. Sec. Ag., Publ. Health Serv.).
- [3] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *Rev. Belge Path. et Méd. exp.*, 1951, **21**, 99.
- [4] MAGNUSON et THOMPSON. *J. Immunol.*, 1951, **67**, 35.
- [5] GASTINEL et COLLART. *Bull. Soc. Française Dermat. et Syphil.*, 1951, **58**, 444.

IDENTITÉ BIOCHIMIQUE ENTRE CERTAINES SOUCHES DE *B. ANITRATUM* ET *MORAXELLA LWOFFI*

par J. BRISOU et R. MORICHAU-BEAUCHANT.

(Ecole d'Application des Médecins de la Marine, Toulon.)

En 1939, A. Lwoff décrivait [1] le genre *Moraxella* qu'il considérait comme un membre plus ou moins éloigné de la tribu des *Hemophilae*. Les différentes variétés du genre pouvaient constituer un groupe assez

homogène ainsi caractérisé : bactéries de 0,5 à 1 μ de large sur 1,5 à 3 μ de long avec groupements diplobacillaires fréquents. Formes courtes et longues suivant les procédés de culture. Immobilité. Absence de capsules et de sporulation. Coloration de Gram négative. Parasites des muqueuses oculaires.

Tous les représentants du groupe avaient pour caractère commun l'impossibilité de développement sur milieu synthétique. Beaucoup même ne pouvaient croître qu'en présence de sérum.

Peu après, M^{lle} A. Audureau [2] décrit une nouvelle espèce : *Moraxella lwoffii*, apte aux cultures en milieu synthétique. Elle en distingua deux variétés : *bacteroides* et *bovis*.

Que l'on considère les *Moraxella* typiques ou *Moraxella lwoffii*, aucune espèce ne touche les glucides. Ne sachant à quelle famille rattacher ces microbes, A. Audureau souligna certaines similitudes entre eux et le genre *Alcaligenes*. Mais, invoquant des raisons morphologiques, on les dissocia.

En 1951, Marcus Brooke [3] publiait une étude complète portant sur 86 souches de germes connus sous le nom de B5W ou *Anitratum* qu'avaient décrits primitivement Schaub et Hauber en 1948.

La même année, M. et D. Piéchaud et L. Segond donnèrent les caractères de 26 bactéries qu'ils rapprochaient de *Moraxella lwoffii* et dont ils proposaient de constituer une nouvelle variété dite : *glucidolytica* en raison de leur action sur les sucres.

Ils avaient souligné la similitude de certaines souches avec le germe de Schaub et Hauber.

On a cependant l'impression, lorsque l'on suit de près le comportement biochimique de ces bactéries, qu'elles sont bien proches parentes, sinon identiques. Nous avons comparé les 4 souches les plus typiques suivantes :

De la collection du SerumInstitut de Copenhague (Dr Kauffmann) :

B. anitratum, n° 3826. *B. anitratum*, n° 3777.

De la collection de l'Institut Pasteur de Paris (Dr M. Piéchaud) :

Moraxella glucidolytica, souche Gaillard. *Moraxella* souche Faucon.

Nous avons étudié le comportement de ces souches sur le maximum de milieux. Les caractères observés sont résumés dans le tableau d'ensemble.

Rien dans la morphologie ou la colorabilité ne permettait de différencier les souches. Les germes se présentaient tous sous le même aspect de bacilles très courts, à disposition diplobacillaire et à formes de pseudo-*Neisseriae*. Ils étaient franchement Gram-négatifs.

Certains caractères méritent d'être soulignés :

1° On constatera la similitude absolue des 3 souches : 3826, 3777 et de D. Piéchaud et collaborateurs.

2° Aucune souche ne réduisait les nitrates en nitrites. Cette particularité n'a pas été envisagée dans les publications de A. Audureau et de M. Piéchaud et collaborateurs.

3° Les germes cultivent tous sur les milieux synthétiques au citrate ou au phosphate. On note que les glucidolytiques alcalinisent le milieu au citrate et acidifient le phosphate, alors que le quatrième germe montre un comportement exactement inverse.

4° Toutes les souches sont aérobies strictes.

5° Aucune n'est hémolytique.

6° Dans l'ensemble, les cultures sont très abondantes, crémeuses,

Tableau des caractères biochimiques.

	<i>B. anitratum</i>		<i>Moraxella glucidolytica</i>	
	3826	3777	Gaillard	Faucon
Glucose	+	+	+	—
Xylose	—	—	—	—
Arabinose.	+ 3	+ 3	+ 3	—
Lactose.	—	—	—	—
Mannite	—	—	—	—
Glycérol	—	—	—	—
Indole	—	—	—	—
H ₂ S.	—	—	—	—
Réduction des nitrates . . .	—	—	—	—
Pomme de terre	+	+	+	+ moins dense.
Lait tournesolé.	Rose.	Rose.	Rose.	Inchangé.
Gélatine	—	—	—	—
Gélose glycinée.	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.
Sérum coagulé.	+ N.L.	+ N.L.	+ N.L.	+ N.L.
Milieu synthétique :				
Phosphate	Ac.	Ac.	Ac.	Al.
Citrate	Al.	Al.	Al.	Ac.
Voges-Proskauer	—	—	—	—
Rouge méthyle.	—	—	—	—
Culture anaérobie.	—	—	—	—
Température ordinaire . . .	+	+	+	+
Gélose au sang. Hémolyse. .	—	—	—	—

×, lent; +, positif; —, négatif; N.P., pas de pigment; N.L., non liquéfié; Ac., acide; Al., alcalin.

muqueuses même. Cependant, cultivées à la température ordinaire, ce caractère s'estompe.

7° Aucune souche n'a donné de pigment soluble sur gélose glycinée.

8° Sur pomme de terre, cultures très riches; les trois premières souches ont tendance à brunir le milieu au bout de cinq à six jours. Sur la gélose, les cultures prennent également une teinte grise rehaussée d'une discrète pointe ocre rose.

En somme, nous nous trouvons là en présence d'un ensemble de caractères communs qui ne peut manquer d'attirer l'attention.

Si l'on se penche sur ces analogies et que l'on tente un rapprochement avec les systématiques classiques, rien ne s'oppose à placer ces microbes dans la vaste famille des *Achromobacteriaceae*, genre *Achromobacter*, aussitôt après le genre *Alcaligenes*, et à revenir ainsi à la première impression de A. Audureau, malheureusement abandonnée.

On éviterait ainsi une source continuelle de confusion. Les *Moraxella* resteraient telles que A. Lwoff les a définies, mais *Moraxella lwoffii* changerait « d'état civil ».

Il est évident que des épreuves sérologiques devront consolider cette façon de voir. La fréquence des souches muqueuses gêne en partie la préparation des sérums agglutinants, comme cela est le cas parfois avec les *Klebsiella*. On doit recourir à des artifices tels que le chauffage prolongé pour détruire des antigènes d'enveloppe toujours possibles.

Nous demandons, en définitive, que soit dissipée une équivoque. Mais on laissera aux experts le soin de nommer ces bactéries en souhaitant toutefois de voir figurer le genre *Achromobacter* dans la qualification qui sera retenue. *Achromobacter lwoffii*, ou *Anitratum*, etc., pourront être discutés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. LWOFF. Ces *Annales*, 1939, **62**, 168.
- [2] A. AUDURÉAU. Ces *Annales*, 1940, **64**, 126.
- [3] M. S. BROOKE. *Act. Path.*, 1951, **28**, 338.
- [4] D. et M. PIÉCHAUD et L. SEGOND. Ces *Annales*, 1951, **80**, 97.

Nous adressons nos remerciements à MM. les D^{rs} Kauffmann et D. Piéchaud, qui ont bien voulu nous adresser les souches faisant l'objet de cette étude comparative.

ESCHERICHIA COLI

PRODUIT-IL DE L'HYDROGÈNE SULFURÉ ?

pa. J. BRISOU et P. MORAND.

(Ecole d'application des Médecins de la Marine,
Hôpital Sainte-Anne, Toulon.)

Dans la Classification des Entérobactéries que l'un de nous avait adoptée en 1946 [1],* on divisait les *Escherichia* en deux variétés : $H_2S +$ et $H_2S -$.

Le Sous-Comité des Entérobactéries réuni à Rio-de-Janeiro en 1950 a considéré les *Escherichia* comme ne produisant jamais d'hydrogène sulfuré. Kauffmann insiste sur ce caractère négatif dans sa récente monographie [2].

La question posée ici ne devra donc pas surprendre.

A la suite d'échanges de souches avec un laboratoire étranger, nous nous sommes rendu compte que la production d'hydrogène sulfuré par *Escherichia coli* est essentiellement fonction de la technique de détection mise en œuvre. Une expérience très simple le démontre : Une série de tubes d'eau peptonée ordinaire reçoit une quantité fixe de sels de métaux lourds. Le taux final en sel est fixé à 0,05 p. 100 (taux du milieu gélose-gélatine-chlorure ferreux de Kauffmann).

Un tube sans ions métalliques servira de témoin. Tous sont munis du classique papier au sous-acétate de plomb fixé entre le bouchon et la paroi de verre à quelques millimètres de la surface de culture. On ensemence avec des *Escherichia coli* dont le diagnostic d'espèce avait été confirmé par le laboratoire du Séruminstitut de Copenhague (1).

On complète l'expérience par une autre série de milieux ensemencés avec une *Escherichia*, un *Proteus mirabilis* et un germe du type *Ballerup*, récemment isolés.

Les réactions lues à la sixième heure étaient toutes positives dans les tubes témoins ; toutes négatives là où un ion métallique avait été ajouté. Il y a donc une action nette de l'ion métallique sur la vitesse de la réaction.

Sels de métaux lourds utilisés :

Chlorure ferreux (fraîchement préparé) ;

Citrate de fer ;

Citrate de bismuth ;

Acétate de thallium ;

Acétate de cadmium.

Un tableau d'ensemble résume ces résultats. Le signe + correspond au noircissement du papier au sous-acétate de plomb. Signe ×, réaction faible ; CN = Noircissement du milieu ou du dépôt au fond du tube de culture ; O = pas de culture.

**Production d'H₂S par *Escherichia coli*.
(Culture de vingt-quatre heures).**

PRODUITS	SOUCHES											
	<i>Esch. 34</i>		<i>Esch. 35</i>		<i>Esch. 36</i>		<i>Esch. ga</i>		<i>Prot. mirab.</i>		<i>Baller.</i>	
	37°	20°	37°	20°	37°	20°	37°	20°	37°	20°	37°	20°
Fe Cl ₂ . . .	×	—	—	—	CN	—	+ CN	—	+	+	+	—
Fe Citrate . .	+	—	+	—	×	—	×	—	+	+	+	×
Bi Citrate . .	+ CN	—	×	CN	+ CN	—	— CN	—	+	+	×	0
Tl Acétate . .	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	0
Cd Acétate . .	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	0	0
Témoins . .	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+

(1) Nous remercions M. le Dr F. Kauffmann de ces identifications biochimiques et sérologiques.

On peut conclure de cette expérience :

1° Que la présence d'ions métalliques dans le milieu de culture empêche ou ralentit la production d' H_2S chez certains microbes. Cette action empêchante est particulièrement nette chez *Escherichia*. On ne peut en être étonné, car il s'agit là d'une notion banale de microbiologie générale.

2° Que la croissance et les réactions biochimiques sont encore plus lentes à 20°. La technique proposant la recherche de l'hydrogène sulfuré à 20° et en présence d'un ion métallique lourd place la bactérie dans des conditions où elle ne peut plus former son H_2S . On ne peut donc accepter cette technique de détection sans certaines réserves.

En fait : dans les conditions normales de culture, c'est-à-dire dans un milieu qui ne contient aucun produit hostile, et à 37°, il semble que toutes les *Escherichia*, ou presque toutes, soient capables de produire de l'hydrogène sulfuré. On peut alors se demander jusqu'à quel point il est permis de modifier les caractères biochimiques d'un germe sous prétexte de le faire entrer dans le cadre étroit et arbitraire de nos systématiques.

Il y a là un principe dogmatique que l'on ne saurait négliger. Il faut se conformer aux faits et non les modeler à nos conceptions. Cette note est une occasion pour souligner les erreurs auxquelles peuvent entraîner les milieux trop complexes, destinés, sous le prétexte de « diagnostics rapides », à faire dire à la bactérie le maximum de ce qu'elle possède. Les mixtures où voisinent un sel métallique et deux glucides sont dans ce cas. Bien des germes n'y produisent plus leur hydrogène sulfuré, comme nous avons pu le constater. D'autre part, la présence de deux sucres réalise les conditions de la diauxie de J. Monod. La bactérie ne peut attaquer le sucre B qu'après avoir complètement consommé le sucre A. Si, pour une raison quelconque, la proportion de ce dernier est un peu trop élevée, si le métabolisme du germe est modifié par un ion métallique lourd, le second sucre ne sera pas touché. On peut expliquer ainsi certaines anomalies.

Beaucoup de milieux ont été empiriquement élaborés. Il ne serait pas inutile d'en réviser la constitution à la lumière des acquisitions biochimiques actuelles.

CONCLUSION. — A la question posée au début de cette note, il faut répondre par l'affirmative. Un grand nombre de souches d'*Escherichia* produisent de l'hydrogène sulfuré, à la condition bien entendu de ne pas leur imposer un mode de vie défavorable susceptible de ralentir (20°) ou de troubler (ions métalliques) leur métabolisme.

Des expériences actuellement en cours montreront aux dépens de quels thiocomposés *Escherichia coli* élabore son H_2S . La cystéine joue certainement un rôle de premier ordre. Les résultats de ces recherches seront prochainement publiés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BRISOU. *Les Entérobactéries pathogènes*. Masson, Paris, 1947, p. 19 et suivantes.
- [2] F. KAUFFMANN. *Enterobacteriaceae*. Einar Munksgaard, Copenhague, 1951, tableaux 2, 22 et 23.

NOUVELLE CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA RAGE EN AFRIQUE ÉQUATORIALE FRANÇAISE

par J. CECCALDI.

(Institut Pasteur de Brazzaville.)

La communication de P. Remlinger et J. Bailly sur un cas de rage clinique expérimentalement constatée chez un lapin domestique [1] nous offre l'occasion de reproduire certaines observations consignées dans notre rapport sur le fonctionnement de l'Institut Pasteur en 1944 [2].

Il s'agit de l'histoire d'un singe reconnu expérimentalement atteint de rage et qui mordit un lapin et deux cobayes dont il partageait la cage.

Voici cette histoire :

M^{me} P..., au retour d'un congé pris à Mouyondzi, localité située à 300 kilomètres environ de Brazzaville, ramenait avec elle un singe domestique que lui avait cédé un Africain également propriétaire d'un chien avec lequel ce singe s'amusait habituellement et qui disparut brusquement.

Le retour de Mouyondzi se fait le 25 septembre 1944, en voiture, et le singe partage sa cage avec un lapin et deux cobayes. Au cours du voyage, M^{me} P... note différentes « crises » du singe, à l'occasion desquelles il mord le lapin, les deux cobayes et ronge le bois de la cage.

Une semaine environ après son arrivée à Brazzaville, M^{me} P... constate que son singe paraît malade et qu'il a toujours tendance à mordre tout ce qui est à sa portée.

Le 6 octobre 1944, dans l'après midi, elle est mordue sans provocation, ainsi que des indigènes.

Le singe meurt dans la nuit du 6 au 7 octobre, et il nous est amené ce dernier jour ; son cerveau sert à des passages sur des lapins, cobayes et souris qui succombent paralysés entre le douzième et le quatorzième jour.

La maladie expérimentale provoquée chez ces animaux, ainsi que la présence des corps de Negri décelés dans le cerveau des souris, signent la nature rabique du virus isolé.

Parmi les compagnons de voyage du singe, les deux cobayes mouraient, l'un le 11, l'autre le 17 novembre 1944.

Le cerveau du premier de ces animaux, inoculé par voie intracrânienne à deux souris, déterminait la mort de ces animaux au neuvième jour de leur inoculation ; des corps de Negri étaient mis en évidence dans le cerveau de la seconde souris sacrifiée à l'agonie.

Le second nous fut amené le 15 novembre 1944 avec une paralysie

typique du train postérieur et fut sacrifié agonisant le 17 novembre 1944.

Parallèlement, le lapin qui avait partagé la caisse du singe au retour de Mouyondzi présenta, quelque temps après, les signes évidents d'une agressivité marquée, à telle enseigne que le domestique africain chargé de son entretien faisait remarquer à M^{me} P... que le lapin « était devenu très méchant ».

Ce lapin mourut et nous fut adressé par sa propriétaire qui, en raison des constatations faites sur son singe, le soupçonna fortement d'être mort de rage. Mais, l'animal confié à un boy ne parvint jamais à destination.

En outre, ce lapin, vivant en liberté, avait mordu des coqs et des poules qui moururent dans le mois suivant.

Enfin, le singe de M^{me} P... avait eu l'occasion de mordre deux chiens qui ne présentèrent rien de particulier dans la suite : ces deux animaux avaient été vaccinés préventivement contre la rage dans les cinq mois précédents.

Ajoutons que, dans l'intervalle, le chien, camarade du singe, dont nous avons déjà signalé plus haut la brusque disparition, avait mordu un autre chien, qui mordit lui-même, le 30 janvier 1945, sans provocation, la fille d'un pasteur de la Mission Evangélique de Mouyondzi, qui dut subir le traitement antirabique.

Ce second chien fut capturé le même jour et mourut dans la nuit du 1^{er} au 2 février 1945, c'est-à-dire dans les quarante-huit heures qui suivirent la morsure. Il avait présenté une paralysie du train postérieur le 31 janvier, pas de bave, mais un aboiement inhabituel, rauque. Il fut brûlé après sa mort et son cerveau ne fut pas prélevé.

Cette histoire vient s'ajouter à d'autres déjà rapportées sur le même sujet. Bien que les investigations auxquelles elle donna lieu n'aient pu être multipliées à l'époque autant que nous l'aurions désiré, elles suffirent cependant à affirmer la nature rabique indiscutable du virus isolé, tant en raison de la maladie expérimentale conférée aux animaux inoculés qu'en raison de la mise en évidence des corps de Negri dans le cerveau des souris de passage et dans celui du second cobaye mordu directement par le singe.

L'intérêt de nos observations réside aussi dans le fait que notre lapin mordu par un singe enragé semble avoir présenté, comme le lapin marocain de Remlinger et Bailly, *une forme furieuse de la maladie*.

Militent en effet, en faveur de cette opinion, d'une part le comportement inhabituel de ce lapin devenu très agressif quelque temps après sa morsure par un singe reconnu expérimentalement atteint de rage et la crainte qu'il inspira alors au domestique africain chargé de son entretien ; et, d'autre part, les indications fournies par M^{me} P..., qui nous montrent cet animal mordant les volailles avec lesquelles il cohabite et qui moururent par la suite, dans des délais qu'il ne fut pas possible de déterminer avec exactitude.

Cette observation viendrait, s'il en était besoin, confirmer l'opinion émise depuis près d'un quart de siècle par P. Remlinger [3] quand il affirmait que « le virus rabique et la rage elle-même se comportent dans les pays tropicaux d'une façon très analogue à celle dont ils se comportent en Europe ».

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. REMLINGER et J. BAILLY. Ces *Annales*, 1951, **86**, 311.
[2] J. CECCALDI. *Rapport sur le fonctionnement technique de l'Institut Pasteur de Brazzaville*, 1944, titre V, p. 24-25.
[3] P. REMLINGER. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1928, **21**, 790-797.

SENSIBILITÉ DU MÉRION AUX VIRUS COXSACKIE

par P. LÉPINE, L. CHAUMONT et M^{lle} J. BLUSSON.

(*Institut Pasteur, Service des Virus.*)

Le Mériion (*Meriones shawi*) est un rongeur bien connu de nos collègues des Instituts Pasteur nord-africains qui, depuis Ch. Nicolle, l'ont employé souvent pour leurs recherches.

Grâce à P. Durand, directeur de l'Institut Pasteur de Tunis, qui nous a aimablement procuré 6 mériions, nous avons pu organiser un élevage de ces animaux. Ils se reproduisent facilement, ont sensiblement les mêmes exigences d'élevage et de nourriture que le Hamster ou le Sigmodon, et leur humeur très douce en fait des animaux de laboratoire faciles à manipuler.

Au cours des travaux que nous poursuivons actuellement sur les virus coxsackie, nous avons été conduits à rechercher des animaux réceptifs au virus, autres que le souriceau nouveau-né. L'utilisation de ce dernier animal met, en effet, rapidement en péril un élevage de souris du fait que chaque inoculation de virus sacrifie une portée entière, et que, du fait de l'immunité qu'elle acquiert au contact des souriceaux inoculés, la mère est rendue inapte à la reproduction de nouvelles portées sensibles.

Les hamsters nouveau-nés présentent une réceptivité aux virus coxsackie comparable pour certaines souches, à celle de la souris, mais dès avant le sevrage, cette sensibilité du hamster a disparu : cet animal ne peut donc servir à remplacer la souris. Les jeunes sigmodons sont moins sensibles encore.

Dès les premiers essais sur le mériion, nous avons été frappés de la très grande sensibilité que manifestait le mériion nouveau-né aux virus coxsackie.

Exemple : Le 24 septembre 1951 on inocule, par voie intrapéritonéale, 4 mériions âgés de vingt-quatre heures avec la souche française 50 328, à son sixième passage sur souriceau. Les 4 mériions succombent dans la nuit du 26 au 27 (troisième jour) et sont en partie dévorés par leur mère. Ils présentent des lésions musculaires intenses, typiques, et dans le système nerveux central une réaction méningée certaine, discrète, sans encéphalite (il s'agit d'une souche appartenant au groupe A de Dalldorf).

A la suite de cet essai, des passages ont été faits sur des mériens âgés de huit jours, de quatre semaines et de un à six mois.

A l'âge de 8 jours, la sensibilité du mérien reste identique à celle du mérien nouveau-né ; avec la même souche 50 328, la mort survient chez tous les animaux d'une semaine le troisième jour de l'inoculation, avec des lésions intenses généralisées à tout le système musculaire.

Pour les mériens inoculés à l'âge de 3 semaines avec la même souche (mériens sevrés et séparés de leur mère), la maladie évolue un peu plus lentement : les animaux sont paralysés le cinquième ou le



Mérien âgé de 1 mois inoculé avec le virus coxsackie (souche 50 328). Animal mort le huitième jour. Lésions musculaires : infiltration et lésions fibrillaires.

sixième jour et meurent habituellement le sixième jour. Les lésions musculaires restent très intenses, avec dégénérescence hyaline formant dans les muscles des masses globuleuses prenant intensément la couleur, et de l'infiltration entre les fibres musculaires. Les lésions sont particulièrement marquées dans le myocarde, fortement infiltré, qui présente des lésions typiques de la fibre musculaire avec vacuolisation et rupture des fibrilles.

Chez le mérien de 1 mois et plus, on voit 50 p. 100 au moins des animaux succomber entre le sixième et le huitième jour, le reste des animaux survivants présentant un état apathique avec amaigrissement. Sacrifiés vers le vingtième jour, ils présentent des lésions musculaires chroniques intenses, avec présence de virus attestée par la transmission à d'autres mériens ou souriceaux.

Toujours avec la même souche, nous avons inoculé le 17 octobre

un mériion âgé de 6 mois. Le 22, il était malade, paralysé, et sacrifié le 25 (septième jour). On retrouve chez lui les altérations typiques avec dégénérescence de la fibre musculaire, disparition de la striation et des foyers d'infiltration à point de départ périvasculaire. Les lésions du myocarde restent très accusées. Le passage du muscle est positif.

Avec une autre souche (51 723), nous avons obtenu constamment la mort de mériions âgés de 1 mois avec les lésions typiques, alors que l'inoculation échouait chez les sigmodons nouveau-nés.

Enfin, chez un mériion âgé de 3 semaines qui avait survécu à l'inoculation alors qu'un congénère avait succombé le sixième jour, une biopsie musculaire pratiquée le vingt-quatrième jour a montré la présence de lésions typiques et de virus : 4 souriceaux inoculés par voie intra-péritonéale avec le muscle biopsé succombent tous le sixième jour avec des lésions typiques.

En résumé, non seulement le mériion nouveau-né présente une sensibilité intense à l'inoculation des virus coxsackie, mais encore le mériion sevré de trois semaines et le jeune mériion adulte se montrent régulièrement sensibles à l'inoculation du virus.

La plupart des animaux ont succombé dans le délai d'une semaine. Ceux plus âgés, qui ont survécu, présentaient tous des lésions typiques et l'inoculation du muscle prélevé après sacrifice ou par biopsie a régulièrement donné des passages positifs sur le souriceau.

En permettant de travailler avec de jeunes adultes, qu'il est possible d'inoculer individuellement et d'isoler, le mériion semble devoir être un auxiliaire précieux dans les recherches sur les virus coxsackie.

DES GERMES PATHOGÈNES PEUVENT-ILS NITRIER DES PROTÉINES ?

par R. DEVIGNAT

(avec la collaboration technique de A. CHEVALIER).

(Institut Pasteur. Laboratoire de la Peste.
[Chef de Service : D^r G. GIRARD].)

La recherche de la réduction en nitrites des nitrates ajoutés aux milieux de culture est une réaction classique communément caractérisée par addition successive des réactifs A (acide sulfanilique) et B (alpha naphthylamine) de Griess, plus ou moins modifiés. A juste titre, l'Association des Bactériologistes américains [1] attire l'attention sur une cause d'erreur possible de cette réaction : l'observation éventuelle, après culture, d'un Griess positif *dans des milieux ne contenant pas de nitrates*. A la vérité, cette erreur, en bouillon non pourvu de nitrates, est une réaction recherchée à des fins diagnostiques, notamment dans l'étude de la peste, depuis les travaux de Micheletti [2], de Petraghani [3] et ceux de Konovalova [4] soulignant, d'une part, le

caractère normalement Griess-positif des souches pesteuses orientales et, d'autre part, le caractère Griess-négatif des souches du sud-est de la Russie. Cependant, cette réaction de Griess en bouillon ordinaire, que donnent certains bacilles pesteux, est sinon confondue, du moins signalée avec la propriété que possèdent ces germes de réduire les nitrates en nitrites.

Il s'agit pourtant de processus biologiques probablement différents, ne fût-ce que dans leur succession, et nous désirons attirer l'attention sur l'intérêt à la fois doctrinal et taxonomique de l'existence d'un Griess devenant positif ou restant négatif dans un milieu soit chimiquement, soit pratiquement dépourvu de nitrates ou de nitrites au départ.

1° *Milieux chimiquement dépourvus de nitrates.* — Nous avons expérimenté 4 milieux peptonés, tous exempts de nitrates décelables (1). Ces milieux étaient composés d'eau peptonée à 1 p. 100, salée à 0,5 p. 100, à base soit de peptone « Uclaf », soit de bacto-peptone (Difco), soit de peptone « Liebig », soit de bacto-tryptose (Difco). Dans les trois premiers de ces milieux, après quarante-huit heures de culture d'un bacille pesteux (souche Congo n° 343-72), la réaction qualitative de Griess devint fortement positive. Dans le dernier, elle ne le devint que faiblement, comme si la dégradation des protéines par la trypsine influençait le phénomène ; au Congo belge, nous avions remarqué une déficience analogue en digestion papaïnique de cœur de bœuf. La réaction de Griess étant considérée comme spécifique et un excès de sensibilité n'étant pas en cause — la réaction prenant en milieu favorable l'allure tout ou rien — il est donc certain que *Pasteurella pestis* peut produire des nitrites dans un milieu chimiquement dépourvu de nitrates. Ceci n'empêche d'ailleurs pas la même souche pesteuse d'être bon réducteur de nitrates préalablement ajoutés aux mêmes milieux, notamment en bacto-tryptose, où le contraste colorimétrique, après addition des réactifs de Griess, est très apparent entre milieu sans nitrate et milieu à 1 p. 100 de nitrate de K.

Parmi les souches de *P. pseudotuberculosis*, l'une (souche New-Orleans), dans les mêmes conditions, reste par contre absolument Griess-négative en milieu chimiquement exempt de nitrate ; elle réduit cependant en nitrite le nitrate de K si on ajoute celui-ci à raison de 1 p. 100. D'autres souches de *P. pseudotuberculosis* se comportent toutefois comme *P. pestis* et donnent des nitrites aux dépens des protéines.

2° *Milieux qualitativement dépourvus de nitrates.* — Dans la pratique courante, on peut considérer un milieu comme qualitativement dépourvu de nitrites ou de nitrates lorsque, avant l'ensemencement, il ne donne pas la teinte rose de la réaction sensible de Griess, même après addition d'un réducteur de nitrate comme la poudre de zinc. Sur bouillon nutritif répondant à ces exigences, la nitrification devient rapidement positive (vingt-quatre heures) après ensemencement de *P. pestis*. Le bouillon étant constitué de décoction de viande additionnée de peptone, et plusieurs échantillons de peptone ayant été

(1) Dosages effectués dans le service du professeur Lemoigne, par H. Girard, que nous remercions de son obligeance.

étudiés séparément, il était intéressant de rechercher la part que pouvait prendre dans la réaction la décoction non peptonée. C'est ainsi que nous avons constaté que cette décoction était très favorable à l'apparition de la réaction de Griess après culture de *P. pestis*. Encore une fois semble intervenir une question de dimension des molécules protéiques. Ultérieurement, nous constatons les propriétés également très favorables de la protéose-peptone (Difco) contenant, elle aussi, de grosses molécules. On peut donc espérer que la chimie sera en mesure de préciser l'origine et le mécanisme de cette nitrification.

Dans le bouillon complet de Liebig et la décoction non peptonée, la souche pseudotuberculeuse New-Orleans reste Griess-négative. Cependant, il apparaît qu'elle métabolise la même protéine que celle qu'utilise le bacille pesteux. En effet, dans une eau peptonée favorable où *P. pseudotuberculosis* fut cultivée pendant vingt-quatre heures, puis stérilisée au bain-marie bouillant, *P. pestis* reste très capable de proliférer en flocons caractéristiques ; mais elle est désormais incapable de rendre le milieu Griess-positif, même après une culture de neuf jours à 29° C. Une autre souche Griess-positif, *Alcaligenes faecalis* (2) ne peut non plus rendre Griess-positif un bouillon favorable préalablement dégradé par culture de vingt-quatre heures de la souche New-Orleans. Par contre, après culture de *Shigella dysenteriae*, Griess-négative, aussi bien *P. pestis* que *A. faecalis* restent capables de provoquer l'apparition de nitrites.

En résumé, il semble donc bien que :

1° *Pasteurella pestis*, et d'autres bactéries, puissent provoquer l'apparition de nitrites aux dépens de certaines protéines des milieux courants de culture, tandis que d'autres bactéries n'ont pas cette capacité.

2° Que *Pasteurella pseudotuberculosis* (souche New-Orléans) soit cependant capable de métaboliser ces mêmes protéines nitrigènes sans atteindre, ou en dépassant le stade nitrite, et que d'autres germes, comme *Shigella dysenteriae*, en soient incapables.

Ajoutons enfin que la réaction de Griess, effectuée dans les conditions rapportées dans cette note, ne saurait être utilisée comme critère de différenciation de *P. pestis* et *P. pseudotuberculosis*, comme l'avait écrit Petragani. G. Girard n'avait pas confirmé cette donnée [5] et les recherches complémentaires exécutées depuis sur les 30 souches de la collection de son laboratoire lui ont montré que la majorité se comportait, au point de vue de la réaction de Griess en milieu sans nitrates, comme *P. pestis* (communication verbale).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Manual of methods for pure culture study of Bacteria*. Ed. Society of American Bacteriologists. Biotech. Publications Geneva-New-York, Leaflet VI ; 9^e édition 1942, p. 16.
- [2] E. MICHELETTI. *Ann. Med. nav. colon.*, 1942, **38**, 677.
- [3] G. PETRAGANI. *Bull. Off. Intern. Hyg. publ.*, 1937, **29**, 2522.
- [4] S. KONOVALOVA. *Rev. Microb. Epid. Parasit. Saratov*, 1930, **9**, 513.
- [5] G. GIRARD. *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 244-6.

(2) Due à l'amabilité de P. Thibault, que nous remercions vivement.

DE L'INTÉRÊT DE LA RÉACTION DE GRIESS, EFFECTUÉE SUR BOUILLON DE CULTURE NON NITRATÉ, DANS L'ÉTUDE DE DIVERS GERMES PATHOGÈNES

par R. DEVIGNAT.

(Institut Pasteur. Laboratoire de la Peste.
[Chef de Service : Dr G. GIRARD].)

Dans une note précédente, nous avons souligné, en ce qui concerne *Pasteurella pestis* (1), le caractère particulier de la réaction de Griess effectuée, entre autres, dans un bouillon de culture non additionné de nitrates et n'en contenant pas en quantité soit chimiquement, soit qualitativement décelable. Le bacille pesteux ne possède pas l'apanage d'être le seul à provoquer l'apparition d'un Griess-positif après culture dans ces conditions. Selon Petraghiani [2], le vibron cholérique en est également capable. A ces deux germes Griess-positifs, Henriques [3] ajoute *Alcaligenes faecalis* et des *Shigella* non spécifiées. Il nous a donc paru opportun de contrôler le comportement d'une collection de germes pathogènes types, remis au Cours de Bactériologie de l'Institut Pasteur. Il est extrêmement simple, en effet, d'ajouter X gouttes de chacun des deux réactifs de Griess à une dizaine de centimètres cubes du bouillon nutritif que l'onensemence systématiquement dès que l'on étudie un germe quelconque.

Nous avons ainsi observé des réactions de Griess positives en bouillon ordinaire, en bouillon additionné de liquide d'ascite ou de sérum et même en bouillon VF glucosé en tube de Hall, où *P. pestis*, que l'on sait aérobic facultatif, donne une réaction nettement positive.

Il s'avère que les nombreux germes étudiés sont classables en Griess-positifs et en Griess-négatifs, avec une catégorie intermédiaire, peut-être provisoire, de germes à Griess faiblement positifs.

I. Sont Griess fortement positifs (teinte rouge amarante persistante), selon la nomenclature de Dumas et collaborateurs [4] :

Pasteurella pestis (souche E. V. de Girard et Robic et souche 343-72 Congo) ;

Hemophilus influenzae ;

Moraxella duplex ;

Alcaligenes faecalis ;

Vibrio comma (var. Ogawa) ; *Vibrio El Tor* ; *Vibrio fœtus* et un vibron des eaux ;

Corynebacterium diphtheriae (types *mitis*, *gravis* et *intermedius*) ;

(1) Dans ses variétés que nous avons proposé d'appeler « antiqua » et « orientalis » [4].

Corynebacterium hoffmanni ; *Corynebacterium cutis communis* ;
Corynebacterium preisz-nocardi ;

II. Sont Griess faiblement positifs :

Hemophilus pertussis : teinte rose assez nette ;
Aerobacter aerogenes : teinte rose pâle ;
Klebsiella pneumoniae : teinte rose pâle ;
Proteus morganii et *Proteus rettgeri* : traces ;
Moraxella anitrata et *Moraxella lwoffii* : traces ;
Mycobacterium paratuberculosis (souche Milch Möller) : teinte rose
 se développant lentement.

III. Sont Griess négatifs :

Diplococcus pneumoniae ;
Streptococcus pyogenes et *Str. faecalis* ;
Pasteurella septica (var. aviaire) et *P. pseudotuberculosis* (souche New-
 Orleans) ;
Malleomyces pseudo-mallei ;
Brucella melitensis ; *Br. abortus bovis* et *Br. abortus suis* ;
Hemophilus ducreyi ;
Escherichia coli ; *Esch. coli mutabile* et *Esch. intermedium* ;
Para-coli anaerogenes ; *P.-C. arizona* ; *P.-C. coliforme* et *P.-C.*
aerogenoides ;
Proteus vulgaris et *Pr. mirabilis* ;
Eberthella typhosa ;
Salmonella typhi-murium et *S. anatum* ;
Shigella dysenteriae ; *Sh. de Sachs* ; *Sh. ambigua* ; *Sh. alkalescens* ;
Sh. sonnei ; *Sh. flexneri* II ;
Moraxella lacunata ;
Pseudomonas aeruginosa ;
Listeria monocytogenes ;
Bacteridium anthracis ;
Corynebacterium pyogenes ;
Erysipelothrix rhusiopathiae.

Parmi les germes anaérobies, tous ceux que nous avons éprouvés
 restèrent Griess-négatifs ; ce furent :

Welchia perfringens ;
Clostridium oedematiens ; *Cl. histolyticum* ; *Cl. sporogenes* et *Cl.*
botulinum C ;
Plectridium tetani ;
Veillonella parvula ;
Streptococcus foetidus ;
Staphylococcus activus ;
Ramibacterium ramosum ;
Spherophorus funduliformis ;
Fusiformis fusiformis.

Dans cette série, nous ne relatons que des essais *uniques*, sans prétention définitive, mais qui furent effectués sur des souches authentiques, distribuées pour l'enseignement après sélection par les divers services spécialisés de l'Institut Pasteur.

Parmi les germes à Griess-négatif, il est vraisemblable qu'existent certaines espèces qui peuvent utiliser la où les protéines nitrigènes sans atteindre, ou en dépassant le stade nitrite ; on pourra s'en rendre compte par culture secondaire d'un germe aussi banal qu'*Alcaligenes faecalis* sur une fraction du bouillon de culture préalablement stérilisé.

En conclusion, bien que la technique de la réaction puisse être améliorée dans son rendement et précisée dans son mécanisme, bien qu'au sein d'une même espèce il faille en vérifier la constance, néanmoins, par sa simplicité, la recherche des nitrites en bouillon sans nitrate mérite d'être signalée, n'eût-elle en définitive que l'intérêt épidémiologique de certaines carbohydrases dans les salmonelloses.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. DEVIGNAT. *Bull. Org. mond. Santé*, 1951, 4, 247.
- [2] G. PETRAGNANI. *Bul. Off. Intern. Hyg. publi*, 1937, 29, 2522.
- [3] A. HENRIQUES. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 1942, 21, 227.
- [4] J. Dumas et collab. *Bactériologie médicale*, éd. 1951, à révision annuelle. Flammarion, Paris.

L'EXTRÊME SENSIBILITÉ DES PHAGOCYTES AUX TOXINES MICROBIENNES, AUX TOXINES ANTIBIOTIQUES, AUX LYSATS MICROBIENS

par L. DUCHON.

(Laboratoire de secteur de l'Hôpital Trousseau.)

Dans tout ce qui précède, sur l'étude du conflit cellules-micro-organismes, nous avons exposé des résultats qui mesuraient le potentiel d'activité cellulaire acquis chez l'individu [1]. Résultats qui, d'un sang à l'autre pour un même pathogène, d'un pathogène à l'autre pour un même sang, s'inscrivaient sur une échelle de comparaison allant de 0 à l'incomptabilité. Ce qui, en somme, permettait une certaine marge d'erreur d'une réponse à l'autre.

Dans ce qui va suivre, nous ne nous adressons plus à ce potentiel extemporané, mais directement au travail de 1 cm³ du même sang pour un même micro-organisme, dans le but de *provoquer* et de préciser comparativement *in vitro* le travail effectué par les cellules placées, d'un groupe de tubes à l'autre, dans des conditions différentes. Ici,

l'on ne peut plus alors prétendre à des résultats aussi expressifs. Dans les cas favorables il faudra être satisfait d'obtenir des termes de comparaison allant du simple au double. Toute marge d'erreur n'est donc plus possible. C'est dire que les conditions imposées par la méthode devront être serrées de très près.

EXPÉRIMENTATION. — Toutes les expériences qui suivent comportent un certain nombre de tubes, multiple de 3 (3 tubes restant toujours le minimum indispensable pour la fixation d'un résultat). Les 3 premiers et les 3 derniers sont les tubes témoins.

Les autres jalonneront les incidences des influences auxquelles ils sont soumis. Tous ces tubes subissent les conditions de la méthode : étuve, agitation, ensemencement à la fin de la huitième heure.

1° *Toxines microbiennes*. — Préparons : a) des toxines microbiennes différentes : cultures sur milieux liquides appropriés. Pour les streptocoques et les staphylocoques par exemple, culture de quarante-huit heures sur bouillon T. Filtration sur bougie Chamberland L5.

b) Une suspension microbienne, *Streptococcus hemolyticus* de préférence ou *Staphylococcus aureus*, avec une culture de vingt heures, lavée et diluée en eau peptonée (à 1/50 pour les souches que nous utilisons), mais en quantité suffisante, parce que :

c) On préparera la dilution des toxines, par multiples de 10, directement avec cette suspension, les cellules paraissant mal supporter la trop grande abondance de l'excipient.

Ainsi donc tous les tubes recevront une seule goutte, pour les témoins : 1 goutte de la suspension microbienne ; pour les autres : 1 goutte de cette suspension additionnée de la toxine choisie, à un titre différent. L'erreur introduite ici ne joue pas aux titres utilisés.

Gouttes distribuées avec le même compte-gouttes en commençant par les témoins, puis les autres en suivant l'ordre des dilutions à titres croissants.

Etuve, agitation, ensemencement.

Résultats. — Avec une grande fréquence, mais variable toutefois avec la toxine, on constate que la richesse des cultures provenant des tubes contenant la toxine est plus grande que celle des témoins. La courbe s'inscrit sur le graphique, où les richesses des cultures sont portées en ordonnée, au-dessus de la ligne des témoins. La présence d'une toxine est donc susceptible de diminuer l'activité phagocytolytique bactéricide des cellules.

Il reste des sangs qui ne subissent pas cet effet. Mais on conçoit que la présence d'antitoxines sériques ou même qu'une activité antibiotique de la toxine puissent modifier ces résultats.

Sur la première de ces réserves nous reviendrons ultérieurement.

Pour la seconde, nous n'aurons recours pour l'instant qu'à la pénicilline.

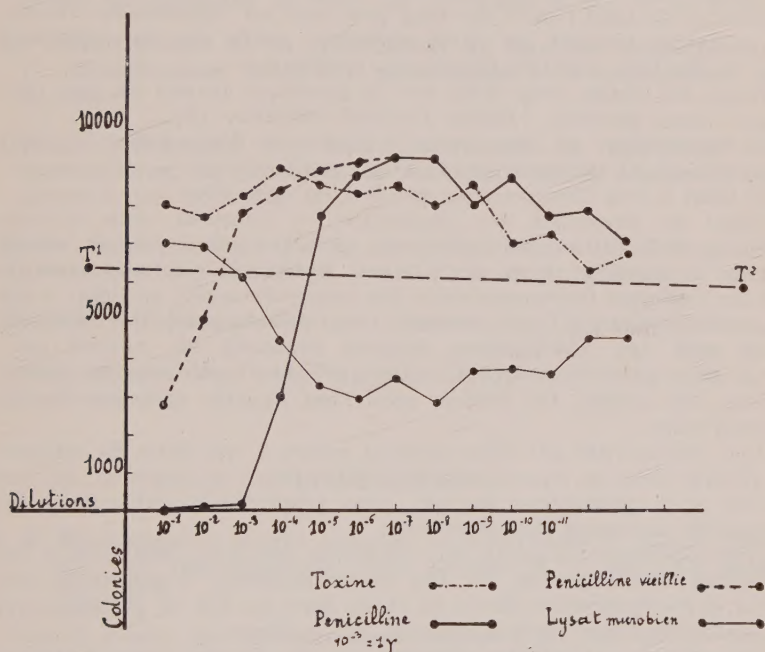
2° *Toxines antibiotiques*. — Partons d'une solution mère de pénicilline du commerce. Nous avons précédemment montré que l'activité antibiotique de la pénicilline s'observait encore à des taux de dilution inférieure à l'unité [2].

Mais pour nos sangs, manipulés toujours identiquement, diminuons encore ces taux.

Constatations : en dépassant le terme de cette activité antibiotique, la courbe des richesses microbiennes pour les sangs normaux, c'est-à-dire non soumis aux influences plus ou moins éloignées de cet antibiotique, ne s'inscrit pas sur la ligne des témoins, mais la croise pour s'inscrire nettement au-dessus.

Ainsi donc, au delà de ce point d'intersection, la pénicilline, perturbant l'activité des cellules, inhibant leur fonction, fait œuvre de toxine.

Ce qui n'exclut pas d'ailleurs, bien entendu, cette toxicité lorsque,



aux dilutions faibles, elle est masquée par l'activité antibiotique : pour s'en assurer, il n'est que d'utiliser une pénicilline vieillie, on constate alors que la courbe de toxicité gagne vers l'ordonnée pour se substituer peu à peu à celle de l'antibiotisme au fur et à mesure du vieillissement.

3° *Lysat microbien*. — Exactement dans les mêmes conditions, expérimentons spécifiquement différents sangs mis au contact d'un lysat microbien (lyse par le pyocyanique) [3] : lysat de *Staphylococcus aureus* ou lysat de *Streptococcus hemolyticus* suivant que l'on utilise l'un ou l'autre de ces germes comme souche d'observation.

Non toujours, mais à peu près dans la majorité des sangs, la courbe des richesses microbiennes est toute différente de celle observée pour des toxines. Sauf dans les faibles dilutions, la richesse microbienne est nettement plus pauvre que celle des témoins. La courbe s'inscrit donc

au-dessous de leur ligne, mais elle s'en rapproche dans les dilutions faibles pour s'inscrire même parfois au-dessus.

Ceci semble donc exprimer :

a) Que d'une façon générale, à l'inverse des toxines, le lysat microbien provoque l'activité cellulaire;

b) Mais que, à dose élevée, un véritable phénomène de saturation apparaît, indication pour le maniement de la vaccinothérapie antimicrobienne.

Dans la majorité des cas, avons-nous dit... Il reste donc une part de sangs dont les cellules ne subissent pas *in vitro* cette influence bénéfique du lysat ; mais un sang peut être un véhicule de toxines ; le graphique révélant des effets contraires, quelle est leur résultante sur la fonction cellulaire ? Nous en reparlerons.

Donc, un simple coup d'œil sur le graphique permet de voir que, d'une façon générale, l'indice d'activité cellulaire [4] :

a) Décroît pour un sang soumis à l'influence d'une toxine ;

b) Décroît ou est faussé par la toxine antibiotique ;

c) Croît à dose thérapeutique par le lysat microbien.

Degré de sensibilité des phagocytes. — Jusqu'ici nous n'avons point parlé du titre des dilutions. Or, *quel que soit le produit utilisé, toxine, antibiotique, lysat, les dilutions révèlent leur activité dans des limites vraiment insoupçonnables.* On l'observe encore, en effet, à des titres inférieurs au milliardième, titre d'observation très habituel pour nous.

Ce n'est point sans appréhension que nous nous sommes soumis à une telle notion. Les chiffres nous l'ont imposée après des années d'observation.

Une telle activité fait naturellement penser à une sorte de catalyse, à quelque chose se rapprochant d'un phénomène enzymatique. Et, ceci associé à ce cytotropisme flagrant, nous rapproche singulièrement des propriétés analogues des ultra-virus.

Nous discuterons ailleurs sur l'objection que l'on peut faire à des résultats établis parfois sur des ensemencements d'agglutinats tels pour le *Staphylococcus aureus* et aussi, dans un but de précision, sur la nécessité d'une certaine richesse des cultures.

En résumé : L'activité cellulaire de la défense antimicrobienne apparaît d'une sensibilité extrême. Inhibée par les toxines microbiennes aux dilutions atteignant le milliardième, elle est provoquée au contraire aux mêmes doses par les produits de désintégration des corps microbiens (lysats).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. DUCHON. Ces *Annales*, 1952, **82**, 228.
- [2] L. DUCHON. Ces *Annales*, 1951, **81**, 102.
- [3] L. DUCHON. Les bronchopneumonies infantiles et leur traitement par les lysats vaccins. *Thèse* Paris, 1926.
- [4] L. DUCHON. Ces *Annales*, 1952, **82**, 254.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Etude de l'antigène Vi à l'aide d'une technique d'hémagglutination passive, par P. CORVAZIER.

De la richesse d'un sol en micro-organismes nitrificateurs, par M^{lles} O. COPPIER et H. DE BARJAC.

Action inhibitrice des extraits aqueux de tourbe sur la croissance des germes du sol, par J. POCHON et M^{lle} H. DE BARJAC.

Le déterminisme de la sporulation de *Bacillus megatherium*. IV. Constituants minéraux nécessaires à la sporulation, par N. GRELET.

Culture prolongée du tissu conjonctif et épithélial des mammifères en présence de cortisone et de désoxycortico-stérone, par G. BARSKI et G. DE BRION.

Etude expérimentale de la cortisone et de l'ACTH sur la production des anticorps, par L. CARRÈRE et J. ROUX.

Réaction d'hémagglutination passive et d'hémolyse directe au moyen de globules rouges sensibilisés par des substances solubles O et Vi, par L. LE MINOR, M^{me} S. LE MINOR et J. GRABAR.

LIVRES REÇUS

J. D. MacLennan. — *Recent Advances in Bacteriology*. J. and A. Churchill Ltd., 104 Gloucester Place, London W. 1, 1951, 325 pages. Prix : 25 s.

Faut-il avouer que cette troisième édition d'un livre qui a connu un juste succès risque de décevoir le lecteur ? On y retrouve les mêmes chapitres que dans les deux éditions précédentes, chapitres revus et rajeunis par la mention des travaux écoulés depuis et par quelques additions à la bibliographie, mais dans l'ensemble on ne saurait guère qualifier de récentes, dans le chapitre sur la morphologie des micro-organismes, des microphotographies électroniques classiques depuis 1944. Le chapitre sur les antibiotiques et leur action sur les micro-organismes est tellement condensé qu'il perd presque toute raison d'être, malgré une bibliographie assez complète. Certains chapitres, comme celui des toxines clostridiennes, passent complètement sous silence les travaux européens récents. L'étude de la synthèse des vitamines par les microbes repose surtout sur des travaux classiques. Au fond, l'ouvrage est victime à la fois de son titre prometteur et d'une révision insuffisante du texte. Souhaitons qu'une édition ultérieure répare ces omissions.

P. L.

D. G. Gatcheside. — *The genetics of microorganisms.* Sir Isaac Pitman and Sons, Ltd., London, 1951, 223 pages. Prix : 21 s.

Ce livre, nous dit l'auteur, présente la matière d'une série de cours destinés aux chimistes biologistes se spécialisant en microbiologie. Ainsi défini, on ne peut que féliciter l'auteur de son propos et de la manière dont il a traité le sujet.

Neuf chapitres exposent successivement les principes de la génétique appliquée aux végétaux, les mutations, l'adaptation et la reproduction sexuelle, ainsi que les applications qui en résultent aux levures, aux protozoaires, aux bactéries et aux virus, ces derniers étant représentés exclusivement par les bactériophages. Clairement écrit, dans un texte agréable à lire, avec de bons schémas, l'ouvrage est nettement au-dessus d'un niveau élémentaire d'initiation. Il donne de son sujet une vue générale et de bons exemples. La partie mathématique n'a pas été négligée. Dans l'ensemble, il apporte un excellent matériel d'enseignement complété par les références aux travaux originaux cités dans le texte.

P. L.

John Almeyda. — *Major symptoms in clinical medicine.* Henry Kimpton, 25 Bloomsbury way, W. C. 1, London, 1951, 704 pages. Prix : 25 s.

Ce livre, qui fait suite à un premier volume du même auteur sur le même sujet, est au fond un livre de sémiologie diagnostique. Le volume comprend 5 sections consacrées respectivement aux symptômes neurologiques, psychologiques, dermatologiques, locomoteurs et endocrines.

La première partie est de beaucoup la plus importante. Elle traite non seulement les éléments du diagnostic tirés de l'examen du liquide céphalo-rachidien ou de la constatation des paralysies des différents nerfs craniens ou plexus moteurs, mais les symptômes isolés mettant sur la voie d'une affection du système nerveux : hydrocéphalie, perte de l'odorat, troubles de la vision ou de la parole, anomalies pupillaires, insomnies, comas, etc. Chaque chapitre est illustré d'excellents schémas des voies nerveuses intéressées par le symptôme, montrant les niveaux auxquels une atteinte anatomique peut être responsable des phénomènes observés.

Le même principe a présidé à la rédaction des parties suivantes. Il conduit cependant, dans le cas des affections de la peau, à des descriptions dont la rédaction finit par être trop condensée, bien qu'en partie compensée par d'excellentes illustrations. Le même reproche général doit être adressé aux parties suivantes ; en particulier, certains des syndromes endocrines sont réduits à une description par trop schématique pour permettre un diagnostic clinique en toute connaissance de cause.

P. L.

Le Gérant : G. MASSON.